

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005480

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-124524  
Filing date: 20 April 2004 (20.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2004年 4月20日

出願番号  
Application Number: 特願2004-124524

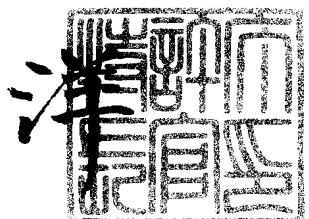
パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号  
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

出願人  
Applicant(s): 株式会社日本触媒

2005年 4月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P04-0356  
【提出日】 平成16年 4月 20日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1-25-12 株式会社日本触媒内  
【氏名】 安田 信三  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1-25-12 株式会社日本触媒内  
【氏名】 向山 正治  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1-25-12 株式会社日本触媒内  
【氏名】 堀川 洋  
【発明者】  
【住所又は居所】 岡山県岡山市宿本町 8-50  
【氏名】 虎谷 哲夫  
【発明者】  
【住所又は居所】 神奈川県相模原市共和 1-3-33-604  
【氏名】 森田 英利  
【特許出願人】  
【識別番号】 000004628  
【氏名又は名称】 株式会社 日本触媒  
【代理人】  
【識別番号】 100091096  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 平木 祐輔  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100096183  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 石井 貞次  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100118773  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 藤田 節  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100101904  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 島村 直己  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 015244  
【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0217688

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌から選択される細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたノックアウト細菌。

【請求項 2】

*pdu*オペロン及びホスホトランスマーザをコードする遺伝子を有する細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたノックアウト細菌。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の細菌とグリセロールとを接触させることにより、1, 3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

【請求項 4】

グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子及びスマールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスマールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスマーザをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない、形質転換体。

【請求項 5】

*pdu*オペロンを有し、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない、請求項 4 記載の形質転換体。

【請求項 6】

プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である請求項 4 又は 5 記載の形質転換体：

(a)配列番号 4-1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b)配列番号 4-1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 7】

プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)の DNA を含む、請求項 4 又は 5 記載の形質転換体：

(a)配列番号 4-2 で表される塩基配列からなる DNA

(b)配列番号 4-2 で表される塩基配列の全部又は一部からなる DNA に対し相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 8】

プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である請求項 4 又は 5 記載の形質転換体：

(a)配列番号 4-3 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b)配列番号 4-3 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロピオン酸キナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 9】

プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)の DNA を含む、請求

項4又は5記載の形質転換体：

(a)配列番号44で表される塩基配列からなるDNA

(b)配列番号44で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつプロピオン酸キナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項10】

請求項4～9のいずれか1項記載の形質転換体とグリセロールとを接触させることにより、1-,3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】1, 3-プロパンジオール及び/又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌から選択される細菌において、グリセロールデヒドゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたノックアウト細菌、グリセロールデヒドラターゼ及び/又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子及びスマールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び/又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスマールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び/又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含みグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない形質転換体、該細菌又は形質転換体を用いてグリセロールから1, 3-プロパンジオール及び/又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

1, 3-プロパンジオールはポリエステル繊維の生産並びにポリウレタン及び環状化合物の製造に使用されるモノマーである。1, 3-プロパンジオール合成経路としては、種々ものが知られている。例えば、ホスフィン、水、一酸化炭素、水素及び酸の存在下、触媒上でのエチレンオキサイドの変換により製造する方法；アクロレインの触媒的液相水和、続いての還元により製造する方法；一酸化炭素及び水素存在下、周期律表のVII族の原子を持っている触媒上で炭化水素（例えば、グリセロール）を反応させることにより製造する方法などが報告されている。しかしながら、伝統的化学合成法は、費用がかかるとともに、環境汚染物質を含んでいる一連の廃棄物を発生するという問題を有していた。

【0003】

これに対し、1, 3-プロパンジオールを製造するための生物学的方法として、グリセロールから1, 3-プロパンジオールへの発酵を触媒する酵素を有する微生物を利用する方法が報告されている（特許文献1～6参照）。グリセロールから1, 3-プロパンジオールを生産できる細菌株が、例えば、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Enterobacter*属、*Salmonella*属、*Klebsiella*属、*Lactobacillus*属、*Caloramator*属及び*Listeria*属に属する細菌の群で発見されている。

【0004】

生物学的系において、グリセロールは2段階の酵素触媒反応を経て、1, 3-プロパンジオールに変換される。第1段階において、グリセロールデヒドラターゼがグリセロールを3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド（3-HPA）及び水へ変換する（グリセロール→3-HPA+H<sub>2</sub>O）。第2段階において、3-HPAがNAD<sup>+</sup>一結合オキシドレダクターゼにより1, 3-プロパンジオールに還元される（3-HPA+NADH+H<sup>+</sup>→1, 3-プロパンジオール+NAD<sup>+</sup>）。1, 3-プロパンジオールはそれ以上代謝されず、結果として媒体中に堆積する。

【0005】

しかし、生物学的系におけるグリセロールからの1, 3-プロパンジオールの生産は、一般に嫌気性条件下でグリセロールを単独の炭素源とし、他の外因性還元当量受容物質の不在下で行われるため、最初に、NAD<sup>+</sup>（又はNADP<sup>+</sup>）結合グリセロールデヒ

ドロゲナーゼによるグリセロールのジヒドロキシアセトン（DHA）への酸化（グリセロール+NAD<sup>+</sup>→DHA+NADH+H）というグリセロールに関する平行経路が働く。そして、DHAは、DHAキナーゼによってジヒドロキシアセトンリン酸ヘリン酸化され、生合成及びATP生成のために利用される。

#### 【0006】

従って、従来の微生物を用いた1,3-プロパンジオールの製造方法においては、原料であるグリセロールの半分が上記平行経路において消費され、原料グリセロールに対する生成物の収率が低く、効率性及びコストの点で問題があった。

#### 【0007】

一方、3-ヒドロキシプロピオン酸及びそのエステルは、脂肪族ポリエステルの原料として有用な化合物であり、また、これらから合成されるポリエステルは生分解性の環境にやさしいポリエステルとして注目されている。

#### 【0008】

3-ヒドロキシプロピオン酸は、通常、アクリル酸に対する水の付加により、又はエチレンクロロヒドリンとシアノ化ナトリウムとの反応により製造される。アクリル酸を水和する反応は平衡反応であるため、反応率が制限されるという問題があった。エチレンクロロヒドリンの反応の場合は、毒性の強い物質の使用が必要であり、さらに加水分解工程を追加しなくてはならない。この場合、塩化ナトリウム及びアンモニウム塩が大量に生じるという問題がある。

#### 【0009】

【特許文献1】WO98/21339

【特許文献2】WO98/21341

【特許文献3】米国特許第5,821,092号

【特許文献4】米国特許第5,254,467号

【特許文献5】米国特許第5,633,362号

【特許文献6】米国特許第5,686,276号

#### 【発明の開示】

##### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

本発明は、グリセロールから1,3-プロパンジオールを製造する際の効率性を改善し、工業上有用なプロセスを提供することを目的とする。

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意検討を行った結果、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌のグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をノックアウトし、該細菌とグリセロールとを接触させることにより、2種類の有用な化合物を効率的に製造できることを見いだし、本発明を完成させるに至った。

#### 【0012】

また、本発明者らは、上記細菌におけるpduオペロンが上記反応に関与することを見いだした。

#### 【0013】

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) *Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌から選択される細菌においてグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたノックアウト細菌。

(2) pduオペロン及びホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子を有する細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたノックアウト細菌。

(3) (1) 又は (2) 記載の細菌とグリセロールとを接触させることにより、1, 3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

#### 【0014】

(4) グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子及びスマールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスマールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない、形質転換体。

(5) pduオペロンを有し、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない、(4) 記載の形質転換体。

#### 【0015】

(6) プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である(4)又は(5)記載の形質転換体：

(a)配列番号41で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b)配列番号41で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質。

#### 【0016】

(7) プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、(4)又は(5)記載の形質転換体：

(a)配列番号42で表される塩基配列からなるDNA

(b)配列番号42で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

#### 【0017】

(8) プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子が以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子である(4)又は(5)記載の形質転換体：

(a)配列番号43で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b)配列番号43で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつプロピオン酸キナーゼ活性を有するタンパク質。

#### 【0018】

(9) プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子が、以下の(a)又は(b)のDNAを含む、(4)又は(5)記載の形質転換体：

(a)配列番号44で表される塩基配列からなるDNA

(b)配列番号44で表される塩基配列の全部又は一部からなるDNAに対し相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつプロピオン酸キナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

#### 【0019】

(10) (4)～(9)のいずれかに記載の形質転換体とグリセロールとを接触させることにより、1, 3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造する方法。

#### 【発明の効果】

## 【0020】

本発明により、グリセロールから1, 3-プロパンジオールを製造する際の原料グリセロールのロスを低減し、かつ1, 3-プロパンジオールと合わせて3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。また、製造に用いる細菌を効率的に培養できるため、より効率的に1, 3-プロパンジオールと合わせて3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。

## 【発明を実施するための最良の形態】

### 【0021】

本発明の細菌は、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌から選択される細菌において、グリセロールデヒドゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされているものである。本発明において、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌は、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、ならびに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を有するものであれば特に制限されない。

### 【0022】

本発明においては、さらに、補酵素B12合成系を有する細菌が好ましく、そのような細菌としては、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Brucella*属細菌、*Fusobacterium*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌が挙げられる。

### 【0023】

*Lactobacillus*属細菌としては、*Lactobacillus reuteri*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus collinoides*、*Lactobacillus hilgardii*、*Lactobacillus diolivorans*、*Lactobacillus buchneri*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus yamanashiensis*等が挙げられる。

### 【0024】

*Salmonella*属細菌としては、*Salmonella enterica*、*Salmonella enteritidis*、*Salmonella typhi*、*Salmonella typhimurium*が挙げられ、*Klebsiella*属細菌としては、*Klebsiella aerogenes*、*Klebsiella oxytoca*、*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella atlantae*、*Klebsiella edwardsii*、*Klebsiella mobilis*、*Klebsiella ozaenae*、*Klebsiella planticola*、*Klebsiella rhinoscleromatis*、*Klebsiella rubiacearum*、*Klebsiella terrigena*が挙げられ、*Listeria*属細菌としては、*Listeria denitrificans*、*Listeria grayi*、*Listeria innocua*、*Listeria ivanovii*、*Listeria monocytogenes*、*Listeria murrayi*、*Listeria seeligeri*、*Listeria welshimeri*が挙げられ、*Clostridium*属細菌としては、*Clostridium acetobutylicum*、*Clostridium butyricum*、*Clostridium pasteurianum*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium perfringens*、*Clostridium glycolicum*、*Clostridium difficile*が挙げられ、*Escherichia*属細菌としては、*Escherichia blattae*、*Escherichia hermannii*、*Escherichia vulneris*、*Escherichia freundii*が挙げられ、*Enterobacter*属細菌としては、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter agglomerans*が挙げられ、*Caloramator*属細菌としては、*Caloramator coolhaasii*、*Caloramator fervidus*、*Caloramator indic*

us、*Caloramator proteoclasticus*、*Caloramator uzoniensis*、*Caloramator viterbiensis*が挙げられ、*Acetobacterium*属細菌としては、*Acetobacterium* sp. が挙げられ、*Brucella*属細菌としては、*Brucella melitensis*が挙げられ、*Flavobacterium*属細菌としては、*Flavobacterium* sp. が挙げられ、*Fusobacterium*属細菌としては、*Fusobacterium nucleatum*が挙げられ、*Citrobacter*属細菌としては、*Citrobacter freundii*が挙げられる。

#### 【0025】

*Propionibacterium*属菌としては、*Propionibacterium acidipropionici*、*Propionibacterium acnes*、*Propionibacterium australiense*、*Propionibacterium avidum*、*Propionibacterium cyclohexanicum*、*Propionibacterium granulosum*、*Propionibacterium jensenii*、*Propionibacterium microaerophilum*、*Propionibacterium propionicum*、*Propionibacterium thoenii*、*Propionibacterium freudenreichii*が挙げられる。

#### 【0026】

本発明においては、好ましくは*Lactobacillus*属細菌、より好ましくは*Lactobacillus reuteri*、特に好ましくは*Lactobacillus reuteri* JCM1112株、好ましくは*Klebsiella*属細菌、より好ましくは*Klebsiella pneumoniae*、*Klebsiella oxytoca*、特に好ましくは*Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955株、*Klebsiella oxytoca* ATCC 8724株を用いる。

#### 【0027】

本発明の細菌は、上記細菌においてグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたものであり、該遺伝子をノックアウトすることにより、グリセロールが酸化されてジヒドロキシアセトンに変換される経路を遮断することができ、より高い収率で1, 3-プロパンジオール及び／又は3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。

#### 【0028】

グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたとは、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子が破壊されて発現できないような状況にあることを意味する。具体的には、該ノックアウト細菌は、細胞中のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を標的遺伝子として、標的遺伝子の任意の位置で相同組換えを起こすベクター（ターゲティングベクター）を用いて当該遺伝子を破壊する方法（ジーンターゲティング法）や、標的遺伝子の任意の位置にトラップベクター（プロモーターを持たないレポーター遺伝子）を挿入して当該遺伝子を破壊しその機能を失わせる方法（遺伝子トラップ法）、それらを組み合わせた方法等の通常当技術分野でノックアウト細胞、トランスジェニック動物（ノックアウト動物含む）等を作製する際に用いられる方法を用いて該細胞中のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することによって作製される。相同置換を起こす位置又はトラップベクターを挿入する位置は、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子の発現の消失をもたらす変異を生じる位置であれば特に限定されないが、好ましくは転写調節領域、より好ましくは第2エクソンを置換する。またグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子をノックアウトする他の方法としては、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子のアンチセンスcDNAを発現するベクターを導入する方法や、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子の2重鎖RNAを発現するベクターを細胞に導入する方法が挙げられる。当該ベクターとしては、ウイルスベクターやプラスミドベクター等が含まれ、通常の遺伝子工学的手法に基づき、例えはMolecular cloning 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書に従い作製することができる。又、市販されているベクターを任意の制限酵素で切断し所望の遺伝子等を組み込んで半合成することもできる。

#### 【0029】

グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子がノックアウトされているか否かは、該ベクターが導入された細胞についてサザンブロットを行い正しく相同組換えが起こっていることを確認することによって、ターゲティングベクターに宿主細胞が有しない薬剤耐性遺伝子を入れておき薬剤耐性の形質が組み込まれたものを選抜することによって、破壊導入後、選抜した株のゲノム、菌体、菌体培養液等をテンプレートにして、破壊するグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子のF側とR側のプライマーを用いてPCRをかけ、グリセロールデ

ヒドロゲナーゼ遺伝子と破壊導入部位の配列を合わせた大きさのDNA断片の増幅を確認することによって、もしくはそれをクローニングして配列解析することによって、又はジヒドロキシアセトンが生成しないことを確認することによって知ることができる。

#### 【0030】

本発明において *Lactobacillus* 属細菌、*Salmonella* 属細菌、*Klebsiella* 属細菌、*Listeria* 属細菌、*Clostridium* 属細菌、*Escherichia* 属細菌、*Enterobacter* 属細菌、*Caloramator* 属細菌、*Acetobacterium* 属細菌、*Brucella* 属細菌、*Flavobacterium* 属細菌、*Fusobacterium* 属細菌、*Citrobacter* 属細菌及び *Propionibacterium* 属細菌は、pduオペロン及びホスホトランスマーカーをコードする遺伝子を有し、かつグリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされているものが好ましい。

#### 【0031】

また、*Lactobacillus* 属細菌、*Salmonella* 属細菌、*Klebsiella* 属細菌、*Listeria* 属細菌、*Clostridium* 属細菌、*Escherichia* 属細菌、*Enterobacter* 属細菌、*Caloramator* 属細菌、*Acetobacterium* 属細菌、*Brucella* 属細菌、*Flavobacterium* 属細菌、*Fusobacterium* 属細菌、*Citrobacter* 属細菌及び *Propionibacterium* 属細菌以外の細菌であっても、pduオペロン及びホスホトランスマーカーをコードする遺伝子を有する細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされた細菌もまた本発明に包含される。

#### 【0032】

pduオペロンとは、多面小胞体タンパク質をコードする遺伝子を含み、該多面小胞体の中でグリセリンを含む1,2-ジオール類から誘導されるアルデヒドを一定時間滞留させるとともに、小胞体内、小胞体膜、およびその近傍において、アルデヒドからの酸やアルコールへの反応を触媒し、アルデヒドによる菌体への直接の悪影響を減じる機能を有するものと考えられる。

#### 【0033】

従って、pduオペロンを有する微生物は、菌体中に多面小胞体を形成し、ジオール類を一旦小胞体内に取り込み、脱水により得られるアルデヒドをある程度保持して菌体の生育に悪影響が及ばないようにするものと考えられる。したがって、アルデヒドの酸化又は還元の反応は、多面小胞体内、小胞体膜あるいはその近傍で起こっていると考えられる。従って、本発明の細菌は、pduオペロンのうちの直接反応に関与するオペロンだけでなく、多面小胞体形成タンパク等をコードするorf、さらにはpduオペロンに含まれるその他のorfを含むことが好ましい。

#### 【0034】

pduオペロンの構造を図1に示し、pduオペロンの塙基配列を配列番号53に示す。また、以下に、各orfとその機能及び *Lactobacillus reuteri* JCM1112株由来の塙基配列を示す。なお、orf1~4はpduオペロンとは無関係であると考えられる。また、pduObisについても本発明に係る反応には無関係であると考えられる。

pduF	グリセロール摂取促進因子(配列番号54)
orf1	エタノールアミン利用系のEutJ(配列番号55)
orcR	転写制御因子(配列番号56)
pduAB	多面小体構成タンパク質(配列番号57及び58)
pduCDE	ジオールデヒドラターゼ(配列番号2、6、10)
pduGH	ジオールデヒドラターゼ再活性化因子(配列番号20及び24)
pduJK	多面小体構成タンパク質(配列番号60及び59)
pduLM	不明(配列番号61及び62)
pduN	多面小体構成タンパク質(配列番号63)
pduObis	アデノシルトランスマーカー(配列番号64及び65)
pduP	プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ(配列番号42)
pduQ	プロパンジオールオキシドレダクターゼ(配列番号14)
pduW	プロピオン酸キナーゼ(配列番号44)

p d u U 多面小体構成タンパク質（配列番号66）  
o r f 2 チロシンホスファターゼ（配列番号67）  
o r f 3 ホスホグリセレートムターゼ（配列番号68）  
o r f 4 カドミウム耐性（輸送タンパク質）（配列番号69）  
p d u V 不明（配列番号70）

### 【0035】

そして、本発明者らは、p d uオペロン有する*Lactobacillus*属細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子をノックアウトすることにより、図2に示す機構に基づき、グリセロールから1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸が生成されることを見いたした。

### 【0036】

図2の作用機構において、酵素の活性を考慮すると、ジオールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子は、グリセロールデヒドラターゼ及びグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子に置換可能であり、プロパンジオールオキシドレダクターゼは、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼに置換可能であり、同様の反応が生じる。

### 【0037】

本発明者らは、上記知見に基づき、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスモールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子を含み、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を含まない形質転換体をグリセロールの存在下で培養することによっても、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造できることを見いたした。

### 【0038】

本発明の形質転換体は、グリセロールを脱水して、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒド及び水へ変換する反応を触媒する酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質としては、グリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼが挙げられる。グリセロールデヒドラターゼ及びジオールデヒドラターゼは、ラージサブユニット、ミディアムサブユニット及びスモールサブユニットの3種のサブユニットから構成される。本発明の形質転換体には、グリセロールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ジオールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ならびにグリセロールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子とジオールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもののいずれをも包含する。

### 【0039】

グリセロールデヒドラターゼ又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットをコードする遺伝子としては、公知のものを使用でき、例えは、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来するグリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットの遺伝子、特に*Lactobacillus reuteri*由来のグリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットの遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株及び*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株由来のグリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼの各サブユニットの遺伝子が好ましい。

#### 【0040】

*Lactobacillus reuteri*由来のグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットのアミノ酸配列を配列番号1及び3に、ミディアムサブユニットのアミノ酸配列を配列番号5及び7に、スマールサブユニットのアミノ酸配列を配列番号9及び11に例示する。*Lactobacillus reuteri*由来のグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号2及び4に、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号6及び8に、スマールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号10及び12に、例示する。

#### 【0041】

各アミノ酸配列を含むタンパク質は、その他2種のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有する限り、各アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

#### 【0042】

また、各配列番号で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、その他2種のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

#### 【0043】

各サブユニットをコードする遺伝子は、同一の宿主で発現させる限り、同一のベクターに導入して形質転換を行ってもよいし、別々のベクターに導入して形質転換を行ってもよい。また、3種のサブユニットは、同一の種又は同一の株に由来するものを用いるのが好ましい。

#### 【0044】

本発明の形質転換体は、3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを還元し、プロパンジオールに変換する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質をコードする遺伝子としては、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及びプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子が挙げられる。

#### 【0045】

プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えは、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来するプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、特に*Lactobacillus reuteri*由来のプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株及び*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株由来のプロパンジオールオキシドレダクターゼが好ましい。

#### 【0046】

配列番号13及び15に*Lactobacillus reuteri*由来のプロパンジオールオキシドレダクターゼのアミノ酸配列を、配列番号14及び16に*Lactobacillus reuteri*由来のプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がプロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有する限り、配列番号13で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

#### 【0047】

また、配列番号14及び16で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

#### 【0048】

1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、公知のものを

使用でき、例えば、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来する1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、特に*Lactobacillus reuteri*由来の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株由来の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子が好ましい。

#### 【0049】

配列番号17に*Lactobacillus reuteri*由来の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼのアミノ酸配列を、配列番号18に*Lactobacillus reuteri*由来の1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質が1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有する限り、配列番号17で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

#### 【0050】

また、配列番号18で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

#### 【0051】

本発明の形質転換体は、グリセロールの3-ヒドロキシプロピオナルデヒド及び水への変換反応を触媒することにより失活したグリセロールデヒドラターゼ又はジオールデヒドラターゼにおける反応中心部分の補酵素B12を入れ替えて、再度活性を取り戻せる役割を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質としては、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子が挙げられる。グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及びジオールデヒドラターゼ再活性化因子は、ラージサブユニット及びスモールサブユニットの2種のサブユニットから構成される。本発明の形質転換体には、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ジオールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもの、ならびにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子とジオールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含むもののいずれをも包含する。

#### 【0052】

同様の作用を有するものであれば、特に制限なく使用できる。グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子としては、WO 98/21341; Daniel et al., J. Bacteriol., 177, 2151 (1995); Toraya and Mori, J. Biol. Chem., 274, 3372 (1999);及びTobimatsu et al., J. Bacteriol. 181, 4110 (1999)に記載のものなどが挙げられる。

#### 【0053】

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子としては、一般に嫌気条件下でグリセロールを資化することのできる細菌群が有するgdhレギュロン、 pduオペロンと呼ばれる遺伝子群内に存在するものが含まれ、例えば、gdhA、gdhB、pduG、pduH、ddhA、ddhB、dhaf、dhag、orfZ、及びorfYなどが挙げられる。

#### 【0054】

グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットをコードする遺伝子としては、公知のものを使用でき、例えば、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来するグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び/又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットの遺伝子、

特に *Lactobacillus reuteri* 由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットの遺伝子、さらに *Lactobacillus reuteri* JCM1112株及び *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子の各サブユニットの遺伝子が好ましい。

#### 【0055】

好ましくは、グリセロールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含む形質転換体は、少なくともグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含み、ジオールデヒドラターゼの3種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含む形質転換体は、少なくともジオールデヒドラターゼ再活性化因子の2種のサブユニットをそれぞれコードする遺伝子を含む。

#### 【0056】

*Lactobacillus reuteri* 由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットのアミノ酸配列を配列番号19及び21に、スマールサブユニットのアミノ酸配列を配列番号23及び25に例示する。*Lactobacillus reuteri* 由来のグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号20及び22に、スマールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を配列番号24及び26に、例示する。

#### 【0057】

各アミノ酸配列を含むタンパク質は、もう一方のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有する限り、各アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

#### 【0058】

また、各配列番号で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、もう一方のサブユニットとともに発現させたときにグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

#### 【0059】

本発明の形質転換体は、プロピオンアルデヒドにCoAを追加し、プロピオニル-CoAを生成する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質をコードする遺伝子としては、プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

#### 【0060】

プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えは、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来するプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子、特に *Lactobacillus reuteri* 由来のプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子、さらに *Lactobacillus reuteri* JCM1112株由来のプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子が好ましい。

#### 【0061】

配列番号41に *Lactobacillus reuteri* 由来のプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を、配列番号42に *Lactobacillus reuteri* 由来のプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の塩基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、配列番号41で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じていてもよい。

#### 【0062】

また、配列番号42で表される塩基配列からなるDNAの全部又は一部の塩基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、

プロピオニアルデヒドデヒドロゲナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

#### 【0063】

本発明の形質転換体は、プロピオニルCoAからCoAをはずし、リン酸を付加してプロピオニルリン酸を生成する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質をコードする遺伝子としては、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

#### 【0064】

ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えば、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来するホスホトランスアシラーゼ遺伝子、特に*Lactobacillus reuteri*由来のホスホトランスアシラーゼ遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株由来のホスホトランスアシラーゼ遺伝子が好ましい。

#### 【0065】

本発明の形質転換体は、プロピオニルリン酸からリン酸をはずし、ADPに付加してATPを生成すると同時にプロピオニ酸を生成する反応を触媒することができる酵素活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を含む。そのようなタンパク質をコードする遺伝子としては、プロピオニ酸キナーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

#### 【0066】

このような酵素活性を有する遺伝子を含むことにより、1,3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオニ酸が生成する反応と同時にATPが生成され、形質転換体が効率的に増殖し、培養を効率的に実施することができる。

#### 【0067】

プロピオニ酸キナーゼをコードする遺伝子は、公知のものを使用でき、例えば、*Lactobacillus*属、*Citrobacter*属、*Clostridium*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属、*Caloramator*属、*Salmonella*属、及び*Listeria*属等に属する細菌に由来するものを使用することができる。本発明においては、*Lactobacillus*属細菌に由来するプロピオニ酸キナーゼ遺伝子、特に*Lactobacillus reuteri*由来のプロピオニ酸キナーゼ遺伝子、さらに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株由来のプロピオニ酸キナーゼ遺伝子が好ましい。

#### 【0068】

配列番号43に*Lactobacillus reuteri*由来のプロピオニ酸キナーゼのアミノ酸配列を、配列番号44に*Lactobacillus reuteri*由来のプロピオニ酸キナーゼ遺伝子の塙基配列を例示する。これらのアミノ酸配列を含むタンパク質がプロピオニ酸キナーゼ活性を有する限り、配列番号43で表されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。

#### 【0069】

また、配列番号44で表される塙基配列からなるDNAの全部又は一部の塙基配列からなるDNAに対し相補的な配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロピオニ酸キナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を用いる場合も本発明に含まれる。

#### 【0070】

本明細書において、各配列番号で表されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じたアミノ酸配列とは、各配列番号で表されるアミノ酸配列の1個、又は好ましくは10～20個、より好ましくは5～10個、さらに好ましくは2～3個のアミノ酸が欠失してもよく、又は各配列番号で表されるアミノ酸配列に1個、又は好ましくは、10～20個、より好ましくは5～10個、さらに好ましくは2～3個のアミノ酸が付加してもよく、又は、各配列番号で表されるアミノ酸配列の1個、又は好ましくは、10～20個、より好ましくは5～10個、さらに好ましくは2～3個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよいことを意味する。

## 【0071】

本明細書において、ストリンジエントな条件とは、特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいい、すなわち、各遺伝子に対し高い相同性（相同性が90%以上、好ましくは95%以上）を有するDNAがハイブリダイズする条件をいう。より具体的には、このような条件は、0.5~1MのNaCl存在下42~68°Cで、又は50%ホルムアミド存在下42°Cで、又は水溶液中65~68°Cで、ハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍濃度のSSC (saline sodium citrate) 溶液を用いて室温~68°Cでフィルターを洗浄することにより達成できる。

## 【0072】

ここで、「一部の配列」とは、各遺伝子の塩基配列の一部分を含むDNAの塩基配列であって、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズさせるのに十分な塩基配列の長さを有するもの、例えは、少なくとも50塩基、好ましくは少なくとも100塩基、より好ましくは少なくとも200塩基の配列である。

## 【0073】

なお、遺伝子に変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法により、例えは部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えはMutan-K (TAKARA社製)、Mutan-G (TAKARA社製)）などを用いて、又は、TAKARA社のLA PCR *in vitro* Mutagenesisシリーズキットを用いて行うことができる。なお、上記手法により塩基配列が決定された後は、化学合成によって、又は染色体DNAを鋳型としたPCR法によって、又は該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

## 【0074】

### 形質転換体の作成

本発明の形質転換体は、上記4種の遺伝子又はその一部を適当なベクターに連結し、得られた組換えベクターを本発明の遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。「一部」とは、宿主中に導入された場合に各遺伝子がコードするタンパク質を発現することができる各遺伝子の一部分を指す。

## 【0075】

バクテリアゲノムから所望の遺伝子を得る方法は、分子生物学の分野において周知である。例えは遺伝子の配列が既知の場合、制限エンドヌクレアーゼ消化により適したゲノムライブラリを作り、所望の遺伝子配列に相補的なプローブを用いてスクリーニングすることができる。配列が単離されたら、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) (米国特許第4,683,202号) のような標準的增幅法を用いてDNAを增幅し、形質転換に適した量のDNAを得ることができる。

## 【0076】

本発明においては、グリセロールデヒドラターゼ及び／又はジオールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子、ミディアムサブユニットをコードする遺伝子及びスマールサブユニットをコードする遺伝子、グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子及び／又はジオールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子及びスマールサブユニットをコードする遺伝子、プロピオナルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子、ホスホトランスアシラーゼをコードする遺伝子、プロピオ酸キナーゼをコードする遺伝子、並びに1,3-プロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子及び／又はプロパンジオールオキシドレダクターゼをコードする遺伝子は、別々にベクターに導入して複数のベクターで形質転換を実施してもよいし、複数種の遺伝子を1つのベクターに導入して形質転換を行ってもよい。

## 【0077】

本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主細胞で複製可能なものであれば特に限定されず、例えはプラスミドDNA、ファージDNA、コスミドDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、例えはpBR322、pSC101、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119、pACYC117、pBlue script II

SK(+)、pETDueT-1、pACYCDuet-1等が挙げられ、ファージDNAとしては、例えば入gt10、Charon 4A、M13mp18、M13mp19等が挙げられる。

### 【0078】

宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えは、*Ralstonia*属細菌、*Pseudomonas*属細菌、*Bacillus*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Propionibacterium*属細菌、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌、*Agrobacterium*属細菌、*Anabaena*属細菌、*Bradyrhizobium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Chlorobium*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Corynebacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Geobacter*属細菌、*Gloeobacter*属細菌、*Leptospira*属細菌、*Mycobacterium*属細菌、*Mycobacterium*属細菌、*Photorhabdus*属細菌、*Porphyromonas*属細菌、*Prochlorococcus*属細菌、*Rhodobacter*属細菌、*Rhodopseudomonas*属細菌、*Sinorhizobium*属細菌、*Streptomyces*属細菌、*Synechococcus*属細菌、*Thermosynechococcus*属細菌、*Treponema*属細菌、*Archaeoglobus*属始原菌、*Halobacterium*属始原菌、*Mesorhizobium*属始原菌、*Methanobacterium*属始原菌、*Methanococcus*属始原菌、*Methanopyrus*属始原菌、*Methanosarcina*属始原菌、*Methanosarcina*属始原菌、*Pyrobaculum*属始原菌、*Sulfolobus*属始原菌、*Thermoplasma*属始原菌、具体的には、*Acetobacterium* sp.、*Citrobacter freundii*、*Flavobacterium* sp.、*Ralstonia solanacearum*、*Ralstonia eutropha*、*Pseudomonas putida*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas denitrificans*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus megaterium*、*Escherichia coli*、*Propionibacterium acidi-propionici*、*Propionibacterium acnes*、*Propionibacterium australiense*、*Propionibacterium avidum*、*Propionibacterium cyclohexanicum*、*Propionibacterium granulosum*、*Propionibacterium jensenii*、*Propionibacterium microaerophilum*、*Propionibacterium propionicum*、*Propionibacterium thoenii*、*Propionibacterium freudenreichii*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Anabaena* sp.、*Bradyrhizobium japonicum*、*Brucella melitensis*、*Brucella suis*、*Chlorobium tepidum*、*Clostridium tetani*、*Clostridium glycolicum*、*Clostridium difficile*、*Corynebacterium diphtheriae*、*Fusobacterium nucleatum*、*Geobacter sulfurreducens*、*Gloeobacter violaceus*、*Leptospira interrogans*、*Mycobacterium bovis*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Photorhabdus luminescens*、*Porphyromonas gingivalis*、*Prochlorococcus marinus*、*Rhodobacter capsulatus*、*Rhodopseudomonas palustris*、*Sinorhizobium meliloti*、*Streptomyces avermitilis*、*Streptomyces coelicolor*、*Synechococcus* sp.、*Thermosynechococcus elongatus*、*Treponema denticola*、*Archaeoglobus fulgidus*、*Halobacterium* sp.、*Mesorhizobium loti*、*Methanobacterium thermoadaptrophicum*、*Methanococcus jannaschii*、*Methanopyrus kandleri*、*Methanosarcina acetivorans*、*Methanosarcina mazei*、*Pyrobaculum aerophilum*、*Sulfolobus solfatarius*、*Sulfolobus tokodaii*、*Thermoplasma acidophilum*、*Thermoplasma volcanium*が挙げられる。

### 【0079】

また、*Saccharomyces cerevisiae*などの*Saccharomyces*属に属する酵母、*Candida malto-sa*などの*Candida*属に属する酵母、COS細胞、CHO細胞、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などの動物細胞、SF9細胞などの昆虫細胞などを使用できる。

### 【0080】

本発明においては、補酵素B12合成系を有するものを宿主として使用するのが好ましい。例えは、*Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Propionibacterium*属細菌、*Agrobacterium*属細菌、*Anabaena*属細菌、*Bacillus*属細菌、*Bradyrhizobium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Chlorobium*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Corynebacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Geobacter*属細菌、*Gloeobacter*属細菌、*Leptospira*属細菌、*Mycobacterium*属細菌、*Mycobacterium*属細菌、*Photorhabdus*属細菌、*Porphyromonas*属細菌、*Prochlorococcus*属細菌、*Pseudomonas*属細菌、*Ralstonia*属細菌、*Rhodobacter*属細菌、*Rhodopseudomonas*属細菌、*Sinorhizobium*属細菌、*Streptomyces*属細菌、*Synechococc*

us属細菌、Thermosynechococcus属細菌、Treponema属細菌、Archaeoglobus属始原菌、Halobacterium属始原菌、Mesorhizobium属始原菌、Methanobacterium属始原菌、Methanococcus属始原菌、Methanopyrus属始原菌、Methanosarcina属始原菌、Methanosarcina属始原菌、Pyrobaculum属始原菌、Sulfolobus属始原菌、Thermoplasma属始原菌、好ましくはPropionibacterium属細菌、特にPropionibacterium freudenreichiiを宿主として使用する。あるいは、補酵素B 1 2合成遺伝子を組み換えにより導入した宿主を用いてもよい。

#### 【0081】

宿主細胞においては、グリセロールデヒドロゲナーゼを発現しない宿主細胞、すなわちグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子を有しない細胞及びグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子をノックアウトした細胞を使用する。これらを用いることにより、グリセロールが酸化されてジヒドロキシアセトンに変換される経路を遮断することができ、より高い収率で1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子をノックアウトする方法については、上記と同様の方法を使用できる。

#### 【0082】

大腸菌等の細菌を宿主として用いる場合は、組換えベクターが該宿主中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、目的とするDNA、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。発現ベクターとしては、広範囲の宿主において複製・保持されるRK2複製起点を有するpLA2917 (ATCC 37355) やRSF1010複製起点を有するpJRD215 (ATCC 37533) 等が挙げられる。

#### 【0083】

プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、T7プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。細菌への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1, 181 (1994)) やエレクトロポレーション法等が挙げられる。

#### 【0084】

酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えばYEp13、YCp50等が挙げられる。プロモーターとしては、例えばgal1-1プロモーター、gal1-10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、GAPプロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 192, 9-1933 (1978)) 、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) 等が挙げられる。

#### 【0085】

動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpCDNA1、pCDNA1/Amp (インビトロジエン社) 等が用いられる。プロモーターとしては、例えば、SRαプロモーター、SV40プロモーター、CMVプロモーター等が挙げられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、特に限定されないが、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

#### 【0086】

遺伝子の単離及び形質転換体の作成については、Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Pressに記載されている。

#### 【0087】

### 1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の製造

本発明において、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の製造は、本発明の細菌又は形質転換体とグリセロールとを接触させ、反応生成物（培養菌体又は培養上清）中に1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を蓄積させ、

1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を採取することにより実施できる。

#### 【0088】

本発明の細菌又は形質転換体とグリセロールとを接触させると、グリセロールの存在下で本発明の細菌又は形質転換体を培養すること、また、本発明の細菌又は形質転換体の培養物の処理物を用いて反応を行うことを包含する。該処理物としては、菌死体、菌体破碎物、菌体破碎物又は培養上清から調製した粗酵素、精製酵素等が挙げられる。また、常法により担体に固定化した菌体、該処理物、酵素等を用いることができる。

#### 【0089】

本発明の細菌又は形質転換体を培養する方法は、通常の方法に従って、炭素源としてグリセロールを用いることにより行われる。例えば、比較的リッチな培地、例えば2培地等を用いて好気培養し、菌体量を増やしてから嫌気条件にし、グリセロールを与えて発酵を行う。pHは、宿主の生育を妨害せず、かつ発酵液から酸を分離するときの障害とならない試薬を用いて調整する。炭酸ナトリウム、アンモニア、ナトリウムイオン供給源、例えば塩化ナトリウムを添加してもよい。また、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、水酸化アンモニウム水溶液、水酸化カルシウム水溶液、炭酸カリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液、酢酸カリウム水溶液等の一般的なアルカリ試薬を用いてもよい。培養期間中pHは、5.0～8.0、好ましくは5.5～7.5に保持する。

#### 【0090】

窒素源としては、例えば、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイーピリカーカー等が挙げられる。また、無機物としては、例えば、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

#### 【0091】

培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG)、インドール酢酸 (IAA) 等を培地に添加することができる。

#### 【0092】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えばRPMI-1640、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、30～40°Cで1～30日間行う。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

#### 【0093】

あるいは、上記において得られた細菌又は形質転換体の培養物から遠心分離などによって集菌を行い、適当なバッファに懸濁する。この菌体懸濁液をグリセロールを含むバッファに懸濁し、反応を行うことによって、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる。反応の条件は、例えば、反応温度は10～80°C、好ましくは15～50°C、反応時間は5分～96時間、好ましくは10分～72時間、pHは5.0～8.0、好ましくは5.5～7.5である。

#### 【0094】

培養培地からの1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の精製法は当該技術分野において周知である。例えば、有機溶媒を用いる抽出、蒸留及びカラムクロマトグラフィーに反応混合物を供することにより、培地から1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を得ることができる（米国特許第5, 356, 812号）。また、限外濾過膜や水などの低分子のみが透過できるゼオライト分離膜などで発酵液の濃縮を行うのが好ましい。濃縮を行うことにより、水を蒸発させるためのエネルギーを低

減することができる。

### 【0095】

培地を高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）分析にかけることにより、1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸を直接同定することもできる。

### 【実施例】

#### 【0096】

（実施例1）グリセロールデヒドラターゼ遺伝子の取得

合成オリゴヌクレオチドプライマー（フォワードプライマー：5'-ATGAAACGTCAAAAAACGATTGAAAGAACTAGAAAAAC-3'（配列番号27）、リバースプライマー：5'-TTAGTTATCGCCCTTTAGCTCTTACGACTT-3'（配列番号28）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、以下の条件でPCR反応を実施した。

#### 【0097】

##### PCR反応組成（μl）

10×Buffer KOD plus	5
2 mM dNTPs	5
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2
ゲノム 111ng / μl	1
KOD plus	1
水	3.4
フォワードプライマー 20 pM	1
リバースプライマー 20 pM	1
反応系体積 計	5.0

#### 【0098】

反応サイクル：（94℃ 2分×1、94℃ 15秒、45～65℃ 30秒、68℃ 5分）×30回、4℃ ∞。

#### 【0099】

断片溶液にTaqプレミックスを等量加えて、72℃で10分、3' A-オーバーハンゲ処理し、精製したサンプルをPCR4-TOPOにTAクローニングした。シーケンサーはABIのPEISM310、3100を使用した。その結果、配列番号2で示されるグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、配列番号6で示されるグリセロールデヒドラターゼのミディアムサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、並びに配列番号10で示されるグリセロールデヒドラターゼのスモールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 【0100】

また、フォワードプライマー：5'-ATGAAACGTCAAAAAACGTTTGAAGAACTA-3'（配列番号29）、リバースプライマー：5'-CTAGTTATCACCCCTGAGCTTCTT-3'（配列番号30）を作成し、*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株のゲノムを鋳型にして、上記と同様にPCR反応及びDNAシークエンスを実施した。その結果、配列番号4で示されるグリセロールデヒドラターゼのラージサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、配列番号8で示されるグリセロールデヒドラターゼのミディアムサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列、並びに配列番号12で示されるグリセロールデヒドラターゼのスモールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 【0101】

（実施例2）プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGGGAGGCATAATTCCAATGGAAAAATA-3'（配列番号31）、リバースプライマー：5'-TTAACGAATTATTGCTTCGTAACCATCTC-3'（配列番号32）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシークエンスを実施した。その結果、配列番号14で示されるプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 【0102】

また、フォワードプライマー：5'-ATGGGAGGCATAATGCCGATG-3'（配列番号33）、リバースプライマー：5'-TTAACGAATTATTGCTTCGTAATCATCTTC-3'（配列番号34）を作成し、*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシークエンスを実施した。その結果、配列番号16で示されるプロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 【0103】

（実施例3）1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGAATAGACAATTGATTGCTTAATGCCAAG-3'（配列番号35）、リバースプライマー：5'-TTAGTAGATGCCATCGTAAGCCTTT-3'（配列番号36）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシークエンスを実施した。その結果、配列番号18で示される1, 3-プロパンジオールオキシドレダクターゼ遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 【0104】

（実施例4）グリセロールデヒドラターゼ再活性化因子遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGGCAACTGAAAAAGTAATTGGTGTGATATT-3'（配列番号37）、リバースプライマー：5'-TCACCTGTTGCCATTCCCTAAAGGGATT-3'（配列番号38）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシークエンスを実施した。配列番号20で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子、並びに配列番号24で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスマールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 【0105】

また、フォワードプライマー：5'-ATGGCAACTGAAAAAGTAATTGGTGTG-3'（配列番号39）、リバースプライマー：5'-TCACCTGTTACCATTCCCTAAAGG-3'（配列番号40）を作成し、*Lactobacillus reuteri* ATCC 53608株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシークエンスを実施した。その結果、配列番号22で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のラージサブユニットをコードする遺伝子、並びに配列番号26で示されるグリセロールデヒドラターゼ再活性化因子のスマールサブユニットをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 【0106】

（実施例5）プロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-ATGCAGATTAATGATATTGAAAGTGTGTA-3'（配列番号47）、リバースプライマー：5'-TTAATACCAAGTTACGTACTGAGAATCC-3'（配列番号48）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシークエンスを実施した。配列番号42で示されるプロピオンアルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 【0107】

（実施例6）プロピオン酸キナーゼ遺伝子の取得

フォワードプライマー：5'-TTGATGCAAAAAAAATCTTCAATTAAATTCTG-3'（配列番号49）、リバースプライマー：5'-TTATTGCTGAGTTACATTACATCAC-3'（配列番号50）を作成し、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のゲノムを鋳型にして、実施例1と同様にPCR反応及びDNAシークエンスを実施した。配列番号44で示されるプロピオン酸キナーゼをコードする遺伝子の塩基配列を決定した。

#### 【0108】

（実施例7）1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸の製造

（1）組み換え微生物の作成

5'-ATGGACCCATTATTCAATCACCGGGTAAATACATCCAGGGCGCTGATGTGATTAATCGTTAAC-3'（プライマー1：配列番号71）をN末端側に付加し、配列5'-CTGGCGAATACCTGAAGCCGCTGGCAGAACGCTGGTAGTGGTGGGTGACAAATTG-3'（プライマー2：配列番号72）を付加したアンピシリン耐性遺伝子（配列番号73）5μgとE. coli TOP10エレクトロコンピテントセル50μl

の混合液を、Bio-Rad社製 Gene-Pulser IIを用いて、0.1 cmキュベットに移した。

#### 【0109】

Gene-Pulser IIを2.0 kV、25 mF、200Ωにセットし、電気パルスを印加した。印加後の混合液をSOC培地250 μlに加え、37℃で1h培養したのち、50 μg/mlのアンピシリンを含むLB培地の寒天プレートに塗布し、アンピシリン耐性株の選抜を行なった。アンピシリン耐性株の中からプライマー1とプライマー2を用いたコロニーPCRにより約2300 bpの断片の増幅が認められた株をグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子ノックアウト菌株とした。

#### 【0110】

*Klebsiella oxytoca* ATCC8724のゲノム1 μgを制限酵素Sau3AI1Uで37℃で10分間処理したサンプルを電気泳動で分離し、25~35 kb周辺のDNAを回収・精製した。これを日本ジーン社製Charomid9-20ベクターにライゲーションして日本ジーン社製Lambda INNでパッケージングし、グリセロールデヒドロゲナーゼをノックアウトした*E. coli* TOP10に感染させて形質転換した。この形質転換体の中から、プローブとして、どの属のpduオペロンにおいてもオペロンの先頭部分にあるpocRのORF中の保存領域であるプローブ1（配列番号74）、どの属のpduオペロンにおいてもオペロンの後半部分にあるpduVのORF中の保存領域であるプローブ2（配列番号75）を選択し、コロニーハイブリダイゼーションを行い2つとも陽性だった菌株を選抜した。

#### 【0111】

##### (2)組み換え微生物の培養

この菌株1 μlループ1搔き分を、クロラムフェニコール100 μg/ml、アンピシリン50 μg/mlを含む2培地5 ml（グリセロール40 g/l、硫酸アンモニウム10 g/l、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g/l、K<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> 6 g/l、酵母エキス40 g/l、硫酸マグネシウム七水和物1 g/l、消泡剤アデカノール20滴/l）で、37℃にて振とうしながら好気条件で、対数増殖後期（OD<sub>660</sub> = 50）まで培養した。この培養液1 mlをとり、再度500 ml坂口フラスコに入れたクロラムフェニコール100 μg/ml、アンピシリン50 μg/mlを含む2培地100 mlに植え継ぎ、37℃にて振とうしながら好気条件で、対数増殖後期（OD<sub>660</sub> = 50）まで培養した。

#### 【0112】

ここでIPTGを1 mMとなるように投入し、2時間おいた。菌体を遠心分離で回収し、1Mのグリセロール200 mMに加え、気相部を窒素に置換した100 mlボトルをボトルローラー上に37℃で5時間おき、その後、液を分析した。その結果、液中には1,3-プロパンジオールが25 mM、3-ヒドロキシプロピオン酸が21 mM含まれていた。

#### 【0113】

##### (実施例8)

グリセロールデヒドロゲナーゼの遺伝子を破壊するため、グリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子の配列（配列番号45）を解析し、開始コドンから830 bp付近のKpnIサイトを選択し制限酵素サイトに破壊導入確認用の薬剤耐性マーカーを導入した。

#### 【0114】

1) *Lactobacillus reuteri* JCM1112株のグリセロールデヒドロゲナーゼの取得とpCR4-TOP0ベクターへの導入

ゲノム情報を元に以下のように、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子部分増幅用プライマーを作成した。

フォワードプライマー: 5'-ATGGTTGAAGAATTGGCTCACCG-3' (配列番号51)

リバースプライマー: 5'-TTACATACGACTATGGTGACAAACG-3' (配列番号52)

PCRによる増幅の結果、目的の1112 bpの断片が作成できたので、これを3' Aオーバーハング処理して更に精製し、インビトロジエンTOP0 TAクローニングkitを用いたTAクローニングを行い、TOP10セルへと形質転換した。pCR4-TOP0ベクターのTAクローニングサイトに*Lactobacillus reuteri* JCM1112株のグリセロールデヒドロゲナーゼ遺伝子部が導入されたプラスミドを持つ形質転換体からプラスミド(pCR4-TOP0/Lb-GDH)を回収した。

## 【0 1 1 5】

### 2) 薬剤耐性マーカー遺伝子の作成と制限酵素処理

既にインターネット上に公開されているpIL253プラスミドの配列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.cgi?db=nucleotide&val=277339>参照) を解析し、乳酸菌で薬剤耐性マーカーとして使用可能なエリスロマイシン耐性遺伝子とそのプロモーター、ターミネーター領域が含まれかつ両末端にKpnIサイトが存在するように配列番号46で表されるDNA断片を合成した。このDNA断片を以下の表1の組成で37℃、2時間、制限酵素処理を行い、精製回収し薬剤耐性マーカー配列とした。

## 【0 1 1 6】

### 【表1】

10×BufferL	10 μl
合成したDNA配列(DNA量1 μg)	30 μl
KpnI	10 μl
精製水	50 μl
計	100 μl

## 【0 1 1 7】

### 3) 破壊導入断片の作成

#### a) 直線化pCR4-TOP0/Lb-GDHの作成

以下の表2の組成で、37℃にて2時間制限酵素処理を行い、約4986bpの直線化プラスミドを回収した。

## 【0 1 1 8】

### 【表2】

10×BufferL	10 μl
PCR4-TOPO / Lb_GDH	50 μl
KpnI	10 μl
精製水	30 μl
計	100 μl

## 【0 1 1 9】

続いて以下の表3の組成で、この直線化pCR4-TOP0/Lb-GDHを37℃で1.5時間アルカリフオスファターゼ処理し、精製回収した。回収された直線化pCR4-TOP0/Lb-GDHの濃度は30ng/μlであった。

## 【0 1 2 0】

### 【表3】

10×BAP Buffer	10 μl
制限酵素処理済みpCR4-TOPO / Lb_GDH	50 μl
BAP(2.5U)	10 μl
精製水	30 μl
計	100 μl

## 【0 1 2 1】

#### b) 破壊導入断片を挿入配列として持つpCR-4/TOP0ベクターの作成

a)で作成した直線化プラスミドと2)で作成した薬剤耐性マークー配列を、ライゲーション反応を行って連結し、*E. coli* TOP10セルに形質転換した。形質転換体の中から破壊導入断片を挿入配列として持つpCR4-TOP0プラスミド(hakai/pCR4-TOP0)を選抜し、回収した。

### 【0122】

#### c) 破壊導入断片の作成

b)で作成したhakai/pCR4-TOP0をテンプレートに1)で使用したプライマーである

フォワードプライマー: 5'-ATGGTTGAAGAATTGGCTCACCG-3' (配列番号51)

リバースプライマー: 5'-TTACATACGACTATGGTGACAAACG-3' (配列番号52)

を用いてPCRを行なったところ、2144bpの目的断片が増幅された。この断片を大量に精製及び濃縮し、平均5μg/μlの濃度に調製し、遺伝子破壊導入実験に用いた。

### 【0123】

#### 4) 遺伝子破壊の導入

##### a) コンピテントセルの作成

以下の手順でコンピテントセルを作成した。

1. MRS培地10ml×5に、終夜培養した*L. reuteri*菌液 各100mlを植菌し、OD<sub>600</sub> = 0.8まで培養した(試験管で培養を行った。ガスパックを使用した嫌気培養で約5~5.5h)。

2. 培養液×5本を50mlファルコンチューブに移し、集菌後、滅菌蒸留水(室温) 30~40mlで3回洗浄した。

3. 滅菌蒸留水(室温) 800mlで懸濁後、1.5mlマイクロチューブに移し、集菌した。

4. 上清を廃棄後、30% (wt/vol) PEG1500(dH<sub>2</sub>O) 250mlで懸濁した。

5. 100mlずつ分注し、-80°Cで保存した。

6. 使用直前に溶解し、エレクトロポレーションに供した。

### 【0124】

#### b) コンピテントセルへの破壊断片の導入

1. 供試プラスミド(5~10ml; 2~3mg)を前記手法で作成したコンピテントセルに添加した。

2. 予め冷却しておいた0.2cmキュベットに混合液を移した。

3. Gene pulserを2.5kV, 25mF, 200Ωにセットし、電気パルスを印加した。

4. すぐに、予め37°Cで保温しておいたMRS brothをtotal 1mlになるように添加し、37°Cで1.5~2hインキュベートした。

5. MRS agar containing erythromycin (2mg/ml)に塗抹し、37°Cで24~48h嫌気培養した(ガスパックで嫌気培養を行った)。

### 【0125】

#### c) 破壊導入株の選抜

b)の培養の結果生育してきたエリスロマイシン耐性株を選抜し、ゲノムを回収した。そのゲノムをテンプレートにPCRにてインサートの確認を行なった。薬剤耐性という形質と、ゲノム上での遺伝子の導入がPCRにて確認できた株を破壊導入株とした。

#### 5) 破壊株を用いた反応

### 【0126】

通常のMRS培地に2%グリセリンが入った培地10mlに終夜培養した破壊株の培養液100μlを加え、37°Cで24h嫌気条件下で培養する。この菌体を2500×gで10分遠心分離して回収後、pH7.5の50mMカリウムリン酸バッファ10mlで2回洗浄後、グリセリン2%を含むpH7.5の50mMカリウムリン酸バッファ10mlを入れ37°Cで反応させた。反応実績は、以下のとおりである。比較例として破壊導入していない乳酸菌を用いた。結果を以下の表4に示す。

### 【0127】

【表4】

## 破壊株の反応成績

反応時間(h)	0	24	48	72	96	120
グリセロール(mM)	200	140	100	50	25	0
1,3-プロパンジオール(mM)	0	29	48	72	85	95
3-ヒドロキシプロピオン酸(mM)	0	27	47	70	83	94

## 野生株の反応成績

反応時間(h)	0	24	48	72	96	120
グリセロール(mM)	200	180	181	180	180	180
1,3-プロパンジオール(mM)	0	10	9	10	9	12
3-ヒドロキシプロピオン酸(mM)	0	0	0	0	0	0

## 【0128】

以上から、本発明により、グリセロールから1, 3-プロパンジオールを製造する際の原料グリセロールのロスを低減し、かつ1, 3-プロパンジオールと合わせて3-ヒドロキシプロピオン酸を製造することができる事が明らかとなった。

## 【0129】

## (実施例9) ホスホトランスアシラーゼ活性の確認

対数増殖後期の菌体 (*Lactobacillus reuteri* JCM1112株) ブロス10mlをpH8の50mMカリウムリン酸バッファ10mlで2回洗浄し、pH8の50mMカリウムリン酸バッファ10mlに再懸濁させ、氷冷しながら超音波にて菌体を破碎する。20,000×gで30分遠心し、上清を粗酵素液とした。この粗酵素液を適当に希釈し、アセチルCoAを加えたpH7.5のバッファに加え、37℃で反応させ、CoAの生成を定量した。その結果、CoAの生成が確認された。

また、*Lactobacillus reuteri* JCM1112株をゲノム解析した結果、ホスホトランスアシラーゼと相同性を持つorfが確認された。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0130】

【図1】pduオペロンの構造を示す。

【図2】グリセロールから1, 3-プロパンジオール及び3-ヒドロキシプロピオン酸が生成される機構の一態様を示す。

## 【配列表フリーテキスト】

## 【0131】

配列番号27～40、46～52：合成オリゴヌクレオチド

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON SHOKUBAI CO., LTD.

<120> Method for producing 1,3-propanediol and 3-hydroxypropionic acid

<130> P04-0356

<160> 75

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 558

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 1

Met Lys Arg Gln Lys Arg Phe Glu Glu Leu Glu Lys Arg Pro Ile His  
1 5 10 15

Gln Asp Thr Phe Val Lys Glu Trp Pro Glu Glu Gly Phe Val Ala Met  
20 25 30

Met Gly Pro Asn Asp Pro Lys Pro Ser Val Lys Val Glu Asn Gly Lys  
35 40 45

Ile Val Glu Met Asp Gly Lys Lys Leu Glu Asp Phe Asp Leu Ile Asp  
50 55 60

Leu Tyr Ile Ala Lys Tyr Gly Ile Asn Ile Asp Asn Val Glu Lys Val  
65 70 75 80

Met Asn Met Asp Ser Thr Lys Ile Ala Arg Met Leu Val Asp Pro Asn  
85 90 95

Val Ser Arg Asp Glu Ile Ile Glu Ile Thr Ser Ala Leu Thr Pro Ala  
100 105 110

Lys Ala Glu Glu Ile Ile Ser Lys Leu Asp Phe Gly Glu Met Ile Met  
115 120 125

Ala Val Lys Lys Met Arg Pro Arg Arg Lys Pro Asp Asn Gln Cys His  
130 135 140

Val Thr Asn Thr Val Asp Asn Pro Val Gln Ile Ala Ala Asp Ala Ala  
145 150 155 160

Asp Ala Ala Leu Arg Gly Phe Pro Glu Gln Glu Thr Thr Thr Ala Val  
165 170 175

Ala Arg Tyr Ala Pro Phe Asn Ala Ile Ser Ile Leu Ile Gly Ala Gln  
180 185 190

Thr Gly Arg Pro Gly Val Leu Thr Gln Cys Ser Val Glu Glu Ala Thr  
195 200 205

Glu Leu Gln Leu Gly Met Arg Gly Phe Thr Ala Tyr Ala Glu Thr Ile  
210 215 220

Ser Val Tyr Gly Thr Asp Arg Val Phe Thr Asp Gly Asp Asp Thr Pro  
225 230 235 240

Trp Ser Lys Gly Phe Leu Ala Ser Cys Tyr Ala Ser Arg Gly Leu Lys  
245 250 255

Met Arg Phe Thr Ser Gly Ala Gly Ser Glu Val Leu Met Gly Tyr Pro  
260 265 270

Glu Gly Lys Ser Met Leu Tyr Leu Glu Ala Arg Cys Ile Leu Leu Thr  
275 280 285

Lys Ala Ser Gly Val Gln Gly Leu Gln Asn Gly Ala Val Ser Cys Ile  
290 295 300

Glu Ile Pro Gly Ala Val Pro Asn Gly Ile Arg Glu Val Leu Gly Glu  
305 310 315 320

Asn Leu Leu Cys Met Met Cys Asp Ile Glu Cys Ala Ser Gly Cys Asp  
325 330 335

Gln Ala Tyr Ser His Ser Asp Met Arg Arg Thr Glu Arg Phe Ile Gly  
340 345 350

Gln Phe Ile Ala Gly Thr Asp Tyr Ile Asn Ser Gly Tyr Ser Ser Thr  
355 360 365

Pro Asn Tyr Asp Asn Thr Phe Ala Gly Ser Asn Thr Asp Ala Met Asp  
370 375 380

Tyr Asp Asp Met Tyr Val Met Glu Arg Asp Leu Gly Gln Tyr Tyr Gly  
385 390 395 400

Ile His Pro Val Lys Glu Glu Thr Ile Ile Lys Ala Arg Asn Lys Ala  
405 410 415

Ala Lys Ala Leu Gln Ala Val Phe Glu Asp Leu Gly Leu Pro Lys Ile  
420 425 430

Thr Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Thr Tyr Ala Asn Thr His Asp Asp  
435 440 445

Met Pro Lys Arg Asp Met Val Ala Asp Met Lys Ala Ala Gln Asp Met  
450 455 460

Met Asp Arg Gly Ile Thr Ala Ile Asp Ile Ile Lys Ala Leu Tyr Asn  
465 470 475 480

His Gly Phe Lys Asp Val Ala Glu Ala Ile Leu Asn Leu Gln Lys Gln  
485 490 495

Lys Val Val Gly Asp Tyr Leu Gln Thr Ser Ser Ile Phe Asp Lys Asp  
500 505 510

Trp Asn Val Thr Ser Ala Val Asn Asp Gly Asn Asp Tyr Gln Gly Pro  
515 520 525

Gly Thr Gly Tyr Arg Leu Tyr Glu Asp Lys Glu Glu Trp Asp Arg Ile  
530 535 540

Lys Asp Leu Pro Phe Ala Leu Asp Pro Glu His Leu Glu Leu  
545 550 555

<210> 2

<211> 1677

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 2

atgaaaacgtc aaaaacgatt tgaagaacta gaaaaacggc caattcatca agatacattt 60

gttaaagaat ggccagaaga aggtttcggt gcaatgatgg ggcttaatga ccctaaggct 120

agtgtaaaag ttgaaaatgg caagatcgta gagatggatg gtaaaaagct cgaagatttt 180

gatttgcattt acttgtacat tgcttaatgtt ggaatcaata ttgacaacgt tgaaaaagtt 240

atgaatatgg attctaccaa gattgcacgg atgcgttggat atcctaatgt ttctcggtat 300

gaaatttattt aaatttacatc agctttgact cctgctaagg ctgaagagat catcagtaag 360

cttgattttt gtgaaatgat tatggctgtc aagaagatgc gcccacgtcg taaggctgac 420

aaccagtgtc acgttaccaa tactgttcat aaccctgttc aaattgtgtgc tgatgtgtc 480

gatgcccgtc ttctgtggatt tccagaacaa gaaaccacga cagctgtggc acgttatgca 540

ccattcaatg ctatttcaat tttaatttgtt gcacaaacag gtcgcccgtt tgtattgaca 600

caatgttctg ttgaaagaagc tactgaattt caatttaggtt tgcgtggttt taccgtat 660

gctgaaacca tttcagttt cggtaactgtat cgtgtatcca ccgtatggta tgatactcca 720

tggtctaag gcttcttggc atcttgcattt gcatcacgtt gtttgaagat gcgatttact 780

tcaagggtgcg gttcagaagt tttgatgggt tatccagaag gtaagtcaat gctttacctt 840

gaagcgcgtt gtatttact tactaaggct tcaggtgttc aaggacttca aaatggtgcc 900

gtaagttgtt ttgaaattcc tggtgctgtt cctaattggta ttctgtggat tctcggtgaa 960

aacttgcattt gtatgtatgtg tgacatcgaa tgtgcttctg gttgtgacca agcatactca 1020

cactccgata	tgccggcggac	tgaacggttt	attggtaat	ttattgcgg	tactgattat	1080
atataactctg	gttactcatac	aactcctaacc	tacgataata	ccttcgctgg	ttcaaacact	1140
gatgctatgg	actacgatga	tatgtatgtt	atggAACgtg	acttgggtca	atattatggt	1200
attcaccctg	ttaaggaaaga	aaccattatt	aaggcacgta	ataaggccgc	taaagccctt	1260
caaggcgtat	ttgaagatct	tggattacca	aagattactg	atgaagaggt	cgaagcagca	1320
acgtatgcta	acacccatga	tgacatgcca	aagcgggata	tggttgcaga	tatgaaggct	1380
gctcaagata	tgatggatcg	tggaattact	gctattgata	ttatcaaggc	attgtacaac	1440
cacggattta	aagatgtcgc	tgaagcaatt	ttgaaccttc	aaaaacaaaa	agttgttggt	1500
gattaccttc	aaacatcttc	tattttgtat	aaagattgga	acgtcacttc	tgctgttaac	1560
gacggaaatg	attatcaagg	accaggtact	ggataccgtc	tatatgaaga	caaggaagaa	1620
tgggatcgga	ttaaagactt	accattcgcc	cttgatccag	aacatttggaa	actgttag	1677

<210> 3  
 <211> 558  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus reuteri

<400> 3

Met	Lys	Arg	Gln	Lys	Arg	Phe	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Pro	Ile	His
1				5					10						15

Gln	Asp	Thr	Phe	Val	Lys	Glu	Trp	Pro	Glu	Glu	Gly	Phe	Val	Ala	Met
					20				25					30	

Met	Gly	Pro	Asn	Asp	Pro	Lys	Pro	Ser	Val	Lys	Val	Glu	Asn	Gly	Lys
					35				40			45			

Ile	Val	Glu	Met	Asp	Gly	Lys	Arg	Glu	Asp	Phe	Asp	Leu	Ile	Asp
			50			55				60				

Leu	Tyr	Ile	Ala	Lys	Tyr	Gly	Ile	Asn	Ile	Asp	Asn	Val	Glu	Lys	Val
65					70				75			80			

Met Asn Met Asp Ser Thr Lys Ile Ala Arg Met Leu Val Asp Pro Asn  
85 90 95

Val Ser Arg Glu Ser Ile Ile Glu Ile Thr Ser Ala Leu Thr Pro Ala  
100 105 110

Lys Ala Glu Glu Ile Ile Ser Lys Leu Asp Phe Gly Glu Met Ile Met  
115 120 125

Ala Ile Lys Lys Met Arg Pro Arg Arg Lys Pro Asp Asn Gln Cys His  
130 135 140

Val Thr Asn Thr Val Asp Asn Pro Val Gln Ile Ala Ala Asp Ala Ala  
145 150 155 160

Asp Ala Ala Leu Arg Gly Phe Pro Glu Gln Glu Thr Thr Ala Val  
165 170 175

Ala Arg Tyr Ala Pro Phe Asn Ala Ile Ser Ile Leu Ile Gly Ala Gln  
180 185 190

Thr Gly Arg Pro Gly Val Leu Thr Gln Cys Ser Val Glu Glu Ala Thr  
195 200 205

Glu Leu Gln Leu Gly Met Arg Gly Phe Thr Ala Tyr Ala Glu Thr Ile  
210 215 220

Ser Val Tyr Gly Thr Asp Arg Val Phe Thr Asp Gly Asp Asp Thr Pro  
225 230 235 240

Trp Ser Lys Gly Phe Leu Ala Ser Cys Tyr Ala Ser Arg Gly Leu Lys  
245 250 255

Met Arg Phe Thr Ser Gly Ala Gly Ser Glu Val Leu Met Gly Tyr Pro  
260 265 270

Glu Gly Lys Ser Met Leu Tyr Leu Glu Ala Arg Cys Ile Leu Leu Thr  
275 280 285

Lys Ala Ser Gly Val Gln Gly Leu Gln Asn Gly Ala Val Ser Cys Ile  
290 295 300

Glut Ile Pro Gly Ala Val Pro Asn Gly Ile Arg Glu Val Leu Gly Glu  
305 310 315 320

Asn Leu Leu Cys Met Met Cys Asp Ile Glu Cys Ala Ser Gly Cys Asp  
325 330 335

Gln Ala Tyr Ser His Ser Asp Met Arg Arg Thr Glu Arg Phe Ile Gly  
340 345 350

Gln Phe Ile Ala Gly Thr Asp Tyr Ile Asn Ser Gly Tyr Ser Ser Thr  
355 360 365

Pro Asn Tyr Asp Asn Thr Phe Ala Gly Ser Asn Thr Asp Ala Met Asp  
370 375 380

Tyr Asp Asp Met Tyr Val Met Glu Arg Asp Leu Gly Gln Tyr Tyr Gly  
385 390 395 400

Ile His Pro Val Gln Glu Glu Thr Ile Ile Lys Ala Arg Asn Lys Ala  
405 410 415

Ala Lys Ala Leu Gln Ala Val Phe Glu Asp Leu Gly Leu Pro Lys Ile  
420 425 430

Thr Asp Glu Glu Val Glu Ala Ala Thr Tyr Ala Asn Thr His Asp Asp  
435 440 445

Met Pro Lys Arg Asp Met Val Ala Asp Met Lys Ala Ala Gln Asp Met  
450 455 460

Met Asp Arg Gly Ile Thr Ala Ile Asp Ile Ile Lys Ala Leu Tyr Asn  
465 470 475 480

His Gly Phe Lys Asp Val Ala Glu Ala Val Leu Asn Leu Gln Lys Gln  
485 490 495

Lys Val Val Gly Asp Tyr Leu Gln Thr Ser Ser Ile Phe Asp Lys Asp  
500 505 510

Trp Asn Ile Thr Ser Ala Val Asn Asp Gly Asn Asp Tyr Gln Gly Pro  
515 520 525

Gly Thr Gly Tyr Arg Leu Tyr Glu Asp Lys Glu Glu Trp Asp Arg Ile  
530 535 540

Lys Asp Leu Pro Phe Ala Leu Asp Pro Glu His Leu Glu Leu  
545 550 555

<210> 4

<211> 1677

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 4

atgaaaacgtc aaaaacgttt tgaagaacta gaaaagcggc caattcatca agatacattt 60

gttaaggaat ggccctgaaga aggtttcggtt gcaatgatgg gtccaaatga cccgaagcca 120

agtgtaaagg ttgaaaacgg taaaattgtc gaaatggatg gcaagaagcg ggaagacttt 180

gacttaattg acctctacat tgctaagtat ggaattaata ttgataacgt tgaaaaagtt 240

atgaatatgg attcaactaa aattgcacgg atgttggttg atccaaatgt ctcacgtgaa 300

tccatcattg aaatttacttc tgcactaact ccagcgaaag ccgaagaaat cattagtaag 360

cttgactttg gtgaaatgat tatggctatc aagaagatgc gtccgcgtcg gaagccggat 420

aaccaatgtc acgttaccaa cacggttgtat aacccagttc aaattgctgc tgatgctgct 480

gatgctgccc ttcgtggttt cccagaacaa gaaactacta ctgcccgttgc ccgttatgca 540

ccatTTaatg ctatTTcaat cttaattgggt gctcaaacag gtcgtcctgg tgtattaaca 600

caatgttctg ttgaagaagc aacggatttgc caattaggaa tgcgtggctt taccgcttat 660

gctgaaacta tttcagtttgc tggtactgac cgggtatttgc tgcgtggctt tgcgtggctt 720

tgtctaaag gattccttgc atcatgttat gcatcgctg gtttgaagat gcggtttact	780
tcaaggcgctg gttcagaagt tttgatgggt taccaggaaag gtaagtcaat gttatatctt	840
gaagcacgtt gtatttact taccaaggct tcaggtgttc aaggacttca aaacggtgcc	900
gtaagttgta ttgaaattcc aggtgctgtt cctaaccgta tccgtgaagt tcttggtgaa	960
aacctattat gtatgtatgtg tgatattgaa tgtgcttctg gttgtgacca agcataactca	1020
cactcagata tgccggcgta tgaacggttt attggtaat ttattgcgg tactgattac	1080
attaattctg gttactcatac aactcctaaca tacgataaca cctttgctgg ttcaaaccacc	1140
gatgcaatgg actacgatga catgtatgtt atggaacgtg acttaggtca atactatgg	1200
attcacccag ttcaagaaga aacaattatt aaggctcgta acaaggctgc taaggcatta	1260
caagctgtat ttgaagatct tggactacct aagattactg atgaagaagt tgaagctgct	1320
acatatgcta acactcatga tgacatgcca aaacgtgaca tggttgcaga tatgaaagcc	1380
gctcaagata tgatggatcg tggcattact gctattgata ttattaaggc tctttataac	1440
catggattta aggatgttgc tgaagctgta ttgaacccttc aaaagcaaaa gtttgcgg	1500
gattaccttc aaacttcatac aatcttgac aaggattgga atatcacttc tgccgtaaat	1560
gacgggaatg actaccaagg tccaggtact ggataccgtc tatatgaaga caaggaagaa	1620
tggatcgaa tcaaagatct tccattcgca cttgatccag aacacttgga actatag	1677

<210> 5  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> Lactobacillus reuteri

<400> 5

Met Ala Asp Ile Asp Glu Asn Leu Leu Arg Lys Ile Val Lys Glu Val	
1	5
	10
	15

Leu Ser Glu Thr Asn Gln Ile Asp Thr Lys Ile Asp Phe Asp Lys Ser	
20	25
	30

Asn Asp Ser Thr Ala Thr Ala Thr Gln Glu Val Gln Gln Pro Asn Ser	
35	40
	45

Lys Ala Val Pro Glu Lys Lys Leu Asp Trp Phe Gln Pro Val Gly Glu  
50 55 60

Ala Lys Pro Gly Tyr Ser Lys Asp Glu Val Val Ile Ala Val Gly Pro  
65 70 75 80

Ala Phe Ala Thr Val Leu Asp Lys Thr Glu Thr Gly Ile Pro His Lys  
85 90 95

Glu Val Leu Arg Gln Val Ile Ala Gly Ile Glu Glu Glu Gly Leu Lys  
100 105 110

Ala Arg Val Val Lys Val Tyr Arg Ser Ser Asp Val Ala Phe Cys Ala  
115 120 125

Val Gln Gly Asp His Leu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Ile Gly Ile Gln  
130 135 140

Ser Lys Gly Thr Thr Val Ile His Gln Lys Asp Gln Asp Pro Leu Gly  
145 150 155 160

Asn Leu Glu Leu Phe Pro Gln Ala Pro Val Leu Thr Pro Glu Thr Tyr  
165 170 175

Arg Ala Ile Gly Lys Asn Ala Ala Met Tyr Ala Lys Gly Glu Ser Pro  
180 185 190

Glu Pro Val Pro Ala Lys Asn Asp Gln Leu Ala Arg Ile His Tyr Gln  
195 200 205

Ala Ile Ser Ala Ile Met His Ile Arg Glu Thr His Gln Val Val Val  
210 215 220

Gly Lys Pro Glu Glu Glu Ile Lys Val Thr Phe Asp  
225 230 235

<210> 6  
<211> 711  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus reuteri*

<210> 7  
<211> 236  
<212> PRT  
<213> *Lactobacillus reuteri*

<4 0 0> 7

Met Ala Asp Ile Asp Glu Asn Leu Leu Arg Lys Ile Val Lys Glu Val  
1 5 10 15

Leu Asn Glu Thr Asn Gln Ile Asp Thr Lys Ile Asn Phe Asp Lys Glu  
 20 25 30

Asn Asn Ser Thr Ala Thr Ala Thr Glu Glu Val Gln Gln Pro Asn Ser  
 35 40 45

Lys Ala Val Pro Glu Lys Lys Leu Asp Trp Phe Gln Pro Ile Gly Glu  
50 55 60

Ala Lys Pro Gly Tyr Ser Lys Asp Glu Val Val Ile Ala Val Gly Pro  
65 70 75 80

Ala Phe Ala Thr Val Leu Asp Lys Thr Glu Thr Gly Ile Pro His Lys  
85 90 95

Glu Val Leu Arg Gln Val Ile Ala Gly Ile Glu Glu Glu Gly Leu Lys  
100 105 110

Ala Arg Val Val Lys Val Tyr Arg Ser Ser Asp Val Ala Phe Cys Ala  
115 120 125

Val Gln Gly Asp His Leu Ser Gly Ser Gly Ile Ala Ile Gly Ile Gln  
130 135 140

Ser Lys Gly Thr Thr Val Ile His Gln Lys Asp Gln Asp Pro Leu Gly  
145 150 155 160

Asn Leu Glu Leu Phe Pro Gln Ala Pro Val Leu Thr Pro Glu Thr Phe  
165 170 175

Arg Ala Ile Gly Lys Asn Ala Ala Met Tyr Ala Lys Gly Glu Ser Pro  
180 185 190

Glu Pro Val Pro Ala Lys Asn Asp Gln Leu Ala Arg Ile His Tyr Gln  
195 200 205

Ala Ile Ser Ala Ile Met His Ile Arg Glu Thr His Gln Val Val Val  
210 215 220

Gly Lys Pro Glu Glu Glu Ile Lys Val Thr Phe Asp  
225 230 235

<210> 8

<211> 711

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 8

atggctgata tcgatgaaaa ttacttcgt aagatcgta aagaagttt aaacgagact 60  
aatcaaattg atactaagat caattttgac aaggaaaata atagtaccgc aactgctact 120  
gaagaagttc aacaacccaa cagcaaggca gttcctgaaa agaaacttga ttggttccaa 180  
ccaattggcg aagcaaaacc agggtaactca aaggatgaag ttgtaatcgc agttggtcct 240  
gcctttgcaa cagttctaga taaaacagaa actgggattc ctcataaaga ggtacttcgt 300  
caagtaattg ccggaattga agaagaggg cttaaagcac gagtagttaa agtctatcgt 360  
tcatcagacg ttgctttctg tgctgttcag ggtgaccact tatctggttc aggaattgca 420  
attggaatcc aatctaaggg aacaactgtt attcacccaa aagaccagga tccattagga 480  
aacctagaat tattccacac agctccggtt cttacaccag aaactttccg ggcaattgg 540  
aagaatgcag caatgtacgc taaaggtgaa tctccagaac cagttccagc taagaacgat 600  
caacttgctc gtattcacta ccaagctatt tcagcaatta tgcataattcg taaaactcac 660  
caagttgttg ttggaaagcc tgaagaagaa atcaaagttt cgttcgat 711

<210> 9

<211> 172

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 9

Met Met Ser Glu Val Asp Asp Leu Val Ala Lys Ile Met Ala Gln Met  
1 5 10 15

Gly Asn Ser Ser Ser Ala Asn Ser Ser Thr Gly Thr Ser Thr Ala Ser  
20 25 30

Thr Ser Lys Glu Met Thr Ala Asp Asp Tyr Pro Leu Tyr Gln Lys His  
35 40 45

Arg Asp Leu Val Lys Thr Pro Lys Gly His Asn Leu Asp Asp Ile Asn  
50 55 60

Leu Gln Lys Val Val Asn Asn Gln Val Asp Pro Lys Glu Leu Arg Ile  
65 70 75 80

Thr Pro Glu Ala Leu Lys Leu Gln Gly Glu Ile Ala Ala Asn Ala Gly  
85 90 95

Arg Pro Ala Ile Gln Lys Asn Leu Gln Arg Ala Ala Glu Leu Thr Arg  
100 105 110

Val Pro Asp Glu Arg Val Leu Glu Met Tyr Asp Ala Leu Arg Pro Phe  
115 120 125

Arg Ser Thr Lys Gln Glu Leu Leu Asn Ile Ala Lys Glu Leu Arg Asp  
130 135 140

Lys Tyr Asp Ala Asn Val Cys Ala Ala Trp Phe Glu Glu Ala Ala Asp  
145 150 155 160

Tyr Tyr Glu Ser Arg Lys Leu Lys Gly Asp Asn  
165 170

<210> 10

<211> 519

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 10

atgatgagtg aagttgatga ttttagtagca aagatcatgg ctcagatggg aaacagttca 60

tctgctaata gctctacagg tacttcaact gcaagtacta gtaagggaaat gacagcagat 120

gattaccac tttatcaaaa gcacccgtat ttagtaaaaa cacaaaagg acacaatctt 180

gatgacatca atttacaaaa agtagtaaat aatcaagttg atcctaaggaa attacggatt 240

acaccagaag cattgaaact tcaaggtgaa attgcagcta atgctggccg tccagctatt 300

caaaaagaatc ttcaacgagc tgcagaattt acacgagttac ctgacgaacg ggttcttggaa 360

atgtatgatg cattgcgtcc tttccgttca actaaggcaag aattattgaa cattgcaaag 420

gaattacggg acaagtatga cgctaatgtt tgcgcagcat ggtttgaaga agctgctgat 480  
tattatgaaa gtcgtaagaa gctaaaggc gataactaa 519  
  
<210> 11  
<211> 171  
<212> PRT  
<213> Lactobacillus reuteri  
  
<400> 11

Met Ser Glu Val Asp Asp Leu Val Ala Lys Ile Met Ala Gln Met Gly  
1 5 10 15

Asn Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Ser Ala Thr Ser Thr Asn Asn  
20 25 30

Gly Lys Glu Met Thr Ala Asp Asp Tyr Pro Leu Tyr Gln Lys His Arg  
35 40 45

Asp Leu Val Lys Thr Pro Ser Gly Lys Lys Leu Asp Asp Ile Thr Leu  
50 55 60

Gln Lys Val Val Asn Asp Gln Val Asp Pro Lys Glu Leu Arg Ile Thr  
65 70 75 80

Pro Glu Ala Leu Lys Leu Gln Gly Glu Ile Ala Ala Asn Ala Gly Arg  
85 90 95

Pro Ala Ile Gln Lys Asn Leu Gln Arg Ala Ala Glu Leu Thr Arg Val  
100 105 110

Pro Asp Glu Arg Val Leu Gln Met Tyr Asp Ala Leu Arg Pro Phe Arg  
115 120 125

Ser Thr Lys Gln Glu Leu Leu Asp Ile Ala Asn Glu Leu Arg Asp Lys  
130 135 140

Tyr His Ala Glu Val Cys Ala Ala Trp Phe Glu Glu Ala Ala Asn Tyr  
145 150 155 160

Tyr Glu Ser Arg Lys Lys Leu Lys Gly Asp Asn  
165 170

<210> 12  
<211> 516  
<212> DNA  
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 12  
atgagtgaaat ttgatgattt agtagcaaaat atcatggcac agatggaaa tagctcatct 60  
tccgatagtt caacaagtgctacttcaaca aataacggta aggaaatgac agcagatgac 120  
tatcctcttt accaaaagca ccgtgatttt gtaaagacac catcaggaaa gaaacttgat 180  
gatattactt tacaaaaggat tgtaaatgat caagttgatc caaaagaatt acggattact 240  
ccagaaggcat taaaacttca aggtgagatc gcagcaaacg ctggtcggcc agcaattcaa 300  
aagaacttac aacgggcagc tgaatttaca cgtgttccag acgaacgtgt tttgcaaatg 360  
tatgatgcat tacggccatt ccgttcaacg aagcaagaat tactagatat tgctaattgaa 420  
ctccgtgata aatatcatgc agaagttatgt gcagcttggt ttgaagaagc tgcaaattac 480  
tatgaaagtc gaaagaagct caagggtgat aacttag 516

<210> 13  
<211> 379  
<212> PRT  
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 13  
Met Gly Gly Ile Ile Pro Met Glu Lys Tyr Ser Met Pro Thr Arg Ile  
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Thr Asp Ser Leu Lys Glu Leu Glu Thr Leu Asn Asn Glu  
20 25 30

Arg Ile Leu Leu Val Cys Asp Ser Phe Leu Pro Gly Ser Asp Thr Leu  
35 40 45

Lys Glu Ile Glu Ser His Ile Lys Asp Asn Asn Lys Cys Glu Ile Phe  
50 55 60

Ser Asp Val Val Pro Asp Pro Pro Leu Asp Lys Ile Met Glu Gly Val  
65 70 75 80

Gln Gln Phe Leu Lys Leu Lys Pro Thr Ile Val Ile Gly Ile Gly Gly  
85 90 95

Gly Ser Ala Leu Asp Thr Gly Lys Gly Ile Arg Phe Phe Gly Glu Lys  
100 105 110

Leu Gly Lys Cys Lys Ile Asn Glu Tyr Ile Ala Ile Pro Thr Thr Ser  
115 120 125

Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Asn Thr Ala Val Ile Ser Asp Thr Lys  
130 135 140

Glu His Arg Lys Ile Pro Ile Leu Glu Asp Tyr Leu Thr Pro Asp Cys  
145 150 155 160

Ala Leu Leu Asp Pro Lys Leu Val Met Thr Ala Pro Lys Ser Val Thr  
165 170 175

Ala Tyr Ser Gly Met Asp Val Leu Thr His Ala Leu Glu Ser Leu Val  
180 185 190

Ala Lys Asp Ala Asn Leu Phe Thr Val Ala Leu Ser Glu Glu Ala Ile  
195 200 205

Asp Ala Val Ile Lys His Leu Val Glu Cys Tyr Arg His Gly Asp Asn  
210 215 220

Val Asp Ala Arg Lys Ile Val His Glu Ala Ser Asn Ile Ala Gly Thr  
225 230 235 240

Ala Phe Asn Ile Ala Gly Leu Gly Ile Cys His Ser Ile Ala His Gln  
245 250 255

Leu Gly Ala Asn Phe His Val Pro His Gly Leu Ala Asn Thr Met Leu  
260 265 270

Leu Pro Tyr Val Ile Ala Tyr Asn Ala Glu His Ser Glu Glu Ala Leu  
275 280 285

His Lys Phe Ala Ile Ala Ala Lys Lys Ala Gly Ile Ala Ala Pro Gly  
290 295 300

Val Gly Asp Arg Leu Ala Val Lys Arg Leu Ile Ala Lys Ile Arg Glu  
305 310 315 320

Met Ala Arg Gln Met Asn Cys Pro Met Thr Leu Gln Ala Phe Gly Val  
325 330 335

Asp Pro Ala Lys Ala Glu Glu Leu Ala Asp Thr Val Val Ala Asn Ala  
340 345 350

Lys Lys Asp Ala Thr Phe Pro Gly Asn Pro Val Val Pro Ser Asp Asn  
355 360 365

Asp Leu Lys Met Val Tyr Glu Ala Ile Ile Arg  
370 375

<210> 14

<211> 1140

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 14

atgggaggca taattccaat ggaaaaatat agtatgccaa cccggattta ttcggaaca 60

gatagtttga aagaactaga gacacttaat aatgaacgta ttttatttagt ctgtgattct 120

ttcttgccctg gtagtgatac cttaaaagaa attgagagtc acatataaggtaataataag 180

tgtgaaattt tctctgatgt tgtcccgat cctccactag ataagattat ggaagggtt 240

caacaattcc ttaaactaa accaacaatt gtgattggta tcggggcgg atcagcttg 300

gatactggta agggaattcg tttctttgg gaaaagttgg gcaagtgc aa gatcaatgaa 360  
tatattgcta ttccaaacaac gagtggtact ggttcagaag ttacgaatac tgcggttatt 420  
tctgatacga aagaacatcg taaaattcct attttggaaag attatttgac acctgattgt 480  
gctttactag atcctaaact agttatgact gctcctaaga gtgttaactgc atattcagga 540  
atggatgttt taacacatgc acttgaatct ttgggttgc ta aggatgc aaa tttattcaca 600  
gttgcattat cagaagaagc aattgatgcc gttattaaac atttagttga gtgttatcgt 660  
cacggcgata atgtggatgc tcgtaagatt gttcatgaag catcaaata tgcggaaact 720  
gcatttaata ttgctggatt agggatttgc cactcaatttgc cgcattcaattt gggagctaatt 780  
ttccacgttc cccatggttt agcaaataca atgctttgc catatgtt catatataat 840  
gctgaacata gtgaagaggc attgcataag tttgcaatttgc ctgctaagaa agctggaaatt 900  
gctgctcctg gagtagggcga tcgtcttgc gtaaaggcgac taattgctaa aattaggaa 960  
atggcacgac aatgaatttgc tccaaatgact cttcaagcat tcgggtttga tcctgctaaa 1020  
gctgaagaat tagctgatac tgggtttgc aatgcgaaga aagatgc aac attccctggc 1080  
aatccagttg ttccattcaga taatgatctg aagatggttt acgaagcaat aattcgtaa 1140

<210> 15  
<211> 379  
<212> PRT  
<213> *Lactobacillus reuteri*

〈400〉 15

Met Gly Gly Ile Met Pro Met Glu Lys Phe Ser Met Pro Thr Arg Ile  
1 5 10 15

Tyr Ser Gly Thr Asp Ser Leu Lys Glu Leu Glu Thr Leu His Asn Glu  
 20 25 30

Arg Ile Leu Leu Val Cys Asp Ser Phe Leu Pro Gly Ser Asp Thr Leu  
 35 40 45

Lys Glu Ile Glu Ser His Ile Asn Asp Ser Asn Lys Cys Glu Ile Phe  
 50 55 60

Ser Asp Val Val Pro Asp Pro Pro Leu Asp Lys Ile Met Glu Gly Val  
65 70 75 80

Gln Gln Phe Leu Lys Leu Lys Pro Thr Ile Val Ile Gly Ile Gly Gly  
85 90 95

Gly Ser Ala Met Asp Thr Gly Lys Gly Ile Arg Phe Phe Gly Glu Lys  
100 105 110

Leu Gly Lys Cys Lys Ile Asn Glu Tyr Ile Ala Ile Pro Thr Thr Ser  
115 120 125

Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Asn Thr Ala Val Ile Ser Asp Thr Lys  
130 135 140

Glu His Arg Lys Ile Pro Ile Leu Glu Asp Tyr Leu Thr Pro Asp Cys  
145 150 155 160

Ala Leu Leu Asp Pro Lys Leu Val Met Thr Ala Pro Lys Ser Val Thr  
165 170 175

Ala Tyr Ser Gly Met Asp Val Leu Thr His Ala Leu Glu Ser Leu Val  
180 185 190

Ala Lys Asp Ala Asn Leu Phe Thr Val Ala Leu Ser Glu Glu Ala Ile  
195 200 205

Asp Ala Val Thr Lys Tyr Leu Val Glu Cys Tyr Arg His Gly Asp Asn  
210 215 220

Val Asp Ala Arg Lys Ile Val His Glu Ala Ser Asn Ile Ala Gly Thr  
225 230 235 240

Ala Phe Asn Ile Ala Gly Leu Gly Ile Cys His Ser Ile Ala His Gln  
245 250 255

Leu Gly Ala Asn Phe His Val Pro His Gly Leu Ala Asn Thr Met Leu  
260 265 270

Leu Pro Tyr Val Val Ala Tyr Asn Ala Glu His Cys Glu Glu Ala Leu  
275 280 285

His Lys Phe Ala Ile Ala Ala Lys Lys Ala Gly Ile Ala Ala Pro Gly  
290 295 300

Val Gly Asp Arg Leu Ala Val Lys Arg Leu Ile Ala Lys Ile Arg Glu  
305 310 315 320

Met Ala Arg Gln Met Asn Cys Pro Met Thr Leu Gln Ala Phe Gly Val  
325 330 335

Asp His Ala Lys Ala Glu Ala Ala Ala Asp Thr Val Val Ala Asn Ala  
340 345 350

Lys Lys Asp Ala Thr Phe Pro Gly Asn Pro Val Val Pro Ser Asp Asp  
355 360 365

Asp Leu Lys Met Ile Tyr Glu Ala Ile Ile Arg  
370 375

<210> 16

<211> 1140

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 16

atgggaggca taatgcccgtt ggaaaaattt agtatgcctt cccgttttta ttccggaaaca 60

gatagtttga aggaatttga aacccttcat aatgaacgaa ttttgttagt ttgtgactca 120

ttcttacctg gtagtgacac attaaaggaa attgagagtc atattaacga cagtaataaa 180

tgtgaaattt tctctgatgt tgtccctgtt ccaccactag ataaaattat ggaagggtt 240

caacagttct taaagctgaa accaacaatt gtaattggta tcgggtgggg ttctgcaatg 300

gacaccggta agggattcg tttcttcgtt gaaaagcttg gcaagtgc当地 aattaatgaa 360

tatattgcaa ttccaacaac cagcggacc ggttcagaag ttactaatac tgcggttatt	420
tctgatacta aggaacacccg gaagattccg attcttgaag attacttaac accagattgt	480
gcattgcttg atcctaagtt agtaatgaca gcaccaaaga gtgttactgc ctactcagga	540
atggatgtat taactcatgc tcttgaatca ttggttgcta aggacgctaa tttgtttacc	600
gttgcattat cagaagaagc cattgatgcg gtaactaagt atcttgttga atgttatacg	660
catggcgata atgtcgatgc acgaaagatc gttcacgaaag catcaaataat tgccggaaca	720
gcctttaaca ttgctggact aggtatttgc cactcaattt cccaccaatt aggtgctaac	780
ttccatgttc ctcatggttt agcaaacaca atgttattgc catatgttgt tgcatacaat	840
gctgaacact gtgaagaagc cttacacaag tttgcaattt ccgctaagaa agccggaatt	900
gctgcacctg gcgttggta ccgttggct gtttagggc tgattgcaaa gattcgtgaa	960
atggcacggc aaatgaattt tccaatgact ctccaaagcat ttggagttga ccacgcaaaa	1020
gcagaaggcag ctgctgatac ggttggct aatgcgaaga aggatgcaac attcccaggc	1080
aatccagttt ttccttcaga tcatgatctg aagatgattt acgaagcaat aattcgtaa	1140

<210> 17  
 <211> 390  
 <212> PRT  
 <213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 17

Met Asn Arg Gln Phe Asp Phe Leu Met Pro Ser Val Asn Phe Phe Gly			
1	5	10	15

Pro Gly Val Ile Ala Lys Ile Gly Asp Arg Ala Lys Met Leu Asn Met		
20	25	30

His Lys Pro Leu Ile Val Thr Thr Glu Gly Leu Ser Lys Ile Asp Asn		
35	40	45

Gly Pro Val Lys Gln Thr Val Ala Ser Leu Glu Lys Ala Gly Val Asp		
50	55	60

Tyr Ala Val Phe Thr Gly Ala Glu Pro Asn Pro Lys Ile Arg Asn Val  
65 70 75 80

Gln Ala Gly Lys Lys Met Tyr Gln Asp Glu Asn Cys Asp Ser Ile Ile  
85 90 95

Thr Val Gly Gly Gly Ser Ala His Asp Cys Gly Lys Gly Ile Gly Ile  
100 105 110

Val Leu Thr Asn Gly Asp Asp Ile Ser Lys Leu Ala Gly Ile Glu Thr  
115 120 125

Leu Lys Asn Pro Leu Pro Pro Leu Met Ala Val Asn Thr Thr Ala Gly  
130 135 140

Thr Gly Ser Glu Leu Thr Arg His Ala Val Ile Thr Asn Glu Lys Thr  
145 150 155 160

His Leu Lys Phe Val Val Val Ser Trp Arg Asn Ile Pro Leu Val Ser  
165 170 175

Phe Asn Asp Pro Met Leu Met Leu Asp Ile Pro Lys Asp Ile Thr Ala  
180 185 190

Ala Thr Gly Cys Asp Ala Phe Val Gln Ala Ile Glu Pro Tyr Val Ser  
195 200 205

Val Asp His Asn Pro Ile Thr Asp Ser Gln Cys Lys Glu Ala Ile Gln  
210 215 220

Leu Ile Gln Thr Ala Leu Pro Glu Val Val Ala Asn Gly His Asn Ile  
225 230 235 240

Glu Ala Arg Thr Lys Met Val Glu Ala Glu Met Leu Ala Gly Met Ala  
245 250 255

Phe Asn Asn Ala Asn Leu Gly Tyr Val His Ala Met Ala His Gln Leu  
260 265 270

Gly Gly Gln Tyr Asp Ala Pro His Gly Val Cys Cys Ala Leu Leu Leu  
275 280 285

Thr Thr Val Glu Glu Tyr Asn Leu Ile Ala Cys Pro Glu Arg Phe Ala  
290 295 300

Glu Leu Ala Lys Val Met Gly Phe Asp Thr Thr Gly Leu Thr Leu Tyr  
305 310 315 320

Glu Ala Ala Gln Lys Ser Ile Asp Gly Met Arg Glu Met Cys Arg Leu  
325 330 335

Val Gly Ile Pro Ser Ser Ile Lys Glu Ile Gly Ala Lys Pro Glu Asp  
340 345 350

Phe Glu Met Met Ala Lys Asn Ala Leu Lys Asp Gly Asn Ala Phe Ser  
355 360 365

Asn Pro Arg Lys Gly Thr Val Glu Asp Ile Val Lys Leu Tyr Gln Lys  
370 375 380

Ala Tyr Asp Gly Ile Tyr  
385 390

<210> 18

<211> 1173

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 18

atgaatagac aatttgattt cttaatgcca agtgtgaact tccttggtcc tggtgttatt 60

gctaaaatggtgatcggtgc aaagatgctc aatatgcaca aaccattgat tgttactact 120

gaaggtttat ccaagattga caatggtcct gtaaagcaaa ccgttgcattc attggaaaag 180

gctggcggtg actatgccgt atttactggc gctgaaccta accctaagat ccggaatgtt 240

caagctggta aaaagatgta ccaagatgaa aactgtgact caattattac tgttgggtggg 300

ggttctgctc acgactgtgg taagggtatc ggtattgttt taactaacgg tcatgacatt 360  
tccaaagcttg ccggaattga aacattgaag aatccacttc caccattgat ggctgttaac 420  
actactgccc gaaactggttc tgaattaact cgtcacgctg ttattactaa cgaaaagact 480  
catttgaagt ttgttgttgt ttcatggcgt aacattccat tggtatcatt caacgatcca 540  
atgttcatgc ttgatattcc aaaagacatt accgctgcta ctgggttgtga tgctttgtt 600  
caggctattg aaccatacgt ttctgttgac cataacccaa ttactgatag tcaatgtaaa 660  
gaagctattc aattaattca aactgcttta ccagaagtag ttgctaattgg tcacaatatt 720  
gaagcacgga ctaagatgg tgaagctgaa atgcctgccc gaatggcctt caataatgcc 780  
aacttaggct atgttcacgc aatggctcac caactcggtg gtcaatatga tgctcctcat 840  
ggtgtttgct gtgccttgct cttgaccact gttgaagaat ataacttaat cgcatgtcca 900  
gagcggtttg ctgaattggc taaggtaatg ggcttgaca ctactggct taccctttac 960  
gaagcagcac aaaagtcaat tgacggatg cgtgaaatgt gccggcttgt tggtattcca 1020  
tcatcaatca aggaaattgg tgctaagcca gaagactttg aatgatggc caagaatgcc 1080  
ctcaaggatg gtaatgcctt ctctaacccaa cgtaaggta ctgttgaaga tattgtaaag 1140  
ctttatcaaa aggcttacga tggcatctac taa 1173

<210> 19  
<211> 616  
<212> PRT  
<213> *Lactobacillus reuteri*

〈400〉 19

Met	Ala	Thr	Glu	Lys	Val	Ile	Gly	Val	Asp	Ile	Gly	Asn	Ser	Ser	Thr
1				5					10					15	

Glu Val Ala Leu Ala Asp Val Ser Asp Ser Gly Gln Val His Phe Ile  
 20 25 30

Asn Ser Gly Ile Ala Pro Thr Thr Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gln Asn  
 35 40 45

Leu Val Gly Ile Arg Asp Ser Ile Thr Gln Val Leu Asn Lys Ser Asn  
50 55 60

Leu Thr Ile Asp Asp Ile Asp Leu Ile Arg Ile Asn Glu Ala Thr Pro  
65 70 75 80

Val Ile Gly Asp Val Ala Met Glu Thr Ile Thr Glu Thr Val Val Thr  
85 90 95

Glu Ser Thr Met Ile Gly His Asn Pro Asn Thr Pro Gly Gly Ile Gly  
100 105 110

Thr Gly Ala Gly Ile Thr Val Arg Leu Leu Asp Leu Leu Lys Lys Thr  
115 120 125

Asp Lys Ser Lys Asn Tyr Ile Val Val Val Pro Lys Asp Ile Asp Phe  
130 135 140

Glu Asp Val Ala Lys Leu Ile Asn Ala Tyr Val Ala Ser Gly Tyr Lys  
145 150 155 160

Ile Thr Ala Ala Ile Leu Arg Asn Asp Asp Gly Val Leu Val Asp Asn  
165 170 175

Arg Leu Asn His Lys Ile Pro Ile Val Asp Glu Val Ala Met Ile Asp  
180 185 190

Lys Val Pro Leu Asn Met Leu Ala Ala Val Glu Val Ala Gly Pro Gly  
195 200 205

Gln Val Ile Ser Gln Leu Ser Asn Pro Tyr Gly Ile Ala Thr Leu Phe  
210 215 220

Gly Leu Thr Pro Glu Glu Thr Lys Asn Ile Val Pro Val Ser Arg Ala  
225 230 235 240

Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Val Val Ile Lys Thr Pro Ala Gly Asp  
245 250 255

Val Lys Ala Arg Val Ile Pro Ala Gly Lys Ile Ile Ile Asn Gly Asp  
260 265 270

Thr Gly Lys Glu Glu Val Gly Val Ser Glu Gly Ala Asp Ala Ile Met  
275 280 285

Lys Lys Val Ser Ser Phe Arg His Ile Asn Asn Ile Thr Gly Glu Ser  
290 295 300

Gly Thr Asn Val Gly Gly Met Leu Glu Asn Val Arg Gln Thr Met Ala  
305 310 315 320

Asp Leu Thr Gly Lys Asn Asp Glu Ile Ala Ile Gln Asp Leu Leu  
325 330 335

Ala Val Asp Thr Gln Val Pro Val Glu Val Arg Gly Gly Leu Ala Gly  
340 345 350

Glu Phe Ser Asn Glu Ser Ala Val Gly Ile Ala Ala Met Val Lys Ser  
355 360 365

Asp His Leu Gln Met Glu Val Ile Ala Lys Leu Ile Glu Lys Glu Phe  
370 375 380

Asn Thr Lys Val Glu Ile Gly Gly Ala Glu Val Glu Ser Ala Ile Arg  
385 390 395 400

Gly Ala Leu Thr Thr Pro Gly Thr Asp Lys Pro Ile Ala Ile Leu Asp  
405 410 415

Leu Gly Ala Gly Ser Thr Asp Ala Ser Ile Ile Asn Lys Glu Asn Asn  
420 425 430

Thr Val Ala Ile His Leu Ala Gly Ala Gly Asp Met Val Thr Met Ile  
435 440 445

Ile Asn Ser Glu Leu Gly Leu Asn Asp Ile His Leu Ala Glu Asp Ile  
450 455 460

Lys Arg Tyr Pro Leu Ala Lys Val Glu Asn Leu Phe Gln Ile Arg His  
465 470 475 480

Glu Asp Gly Ser Val Gln Phe Phe Lys Asp Pro Leu Pro Ser Ser Leu  
485 490 495

Phe Ala Lys Val Val Val Ile Lys Pro Asp Gly Tyr Glu Pro Val Thr  
500 505 510

Gly Asn Pro Ser Ile Glu Lys Ile Lys Leu Val Arg Gln Ser Ala Lys  
515 520 525

Lys Arg Val Phe Val Thr Asn Ala Leu Arg Ala Leu Lys Tyr Val Ser  
530 535 540

Pro Thr Gly Asn Ile Arg Asp Ile Pro Phe Val Val Ile Val Gly Gly  
545 550 555 560

Ser Ala Leu Asp Phe Glu Ile Pro Gln Leu Val Thr Asp Glu Leu Ala  
565 570 575

His Phe Asn Leu Val Ala Gly Arg Gly Asn Val Arg Gly Val Glu Gly  
580 585 590

Pro Arg Asn Ala Val Ala Thr Gly Leu Ile Leu Arg Tyr Gly Glu Glu  
595 600 605

Arg Arg Lys Arg Tyr Glu Gln Arg  
610 615

<210> 20

<211> 1851

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 20

atggcaactg aaaaagtaat tggtgttgat attggaaatt cttccactga agttgcattg 60  
gcagatgtaa gcgatagtg ggcaagttcac tttattaact ctggattgc tcctactact 120  
gggattaaag gtactaagca gaatcttagtt ggaatttaggg attcaattac tcaagttctg 180  
aataaatcta atctgacaat cgatgatatt gatTTaattc gaatcaatga agccacgcca 240  
gtaattggtg atgttgcaat ggaaactatt acagaaacag ttgtAACAGA atcaacaatg 300  
attgggcata atcctaatac accaggtggt ataggaacag gggctgggat aacagttcgt 360  
ttgcttgatec tcttaaagaa aactgataaa agcaaaaatt atattgttgt agttcctaag 420  
gatattgatt ttgaagacgt tgctaaactt atcaatgctt atgttgcctc tggttataaa 480  
ataacagcag caattctaag aaacgatgat ggtgttttag ttgataatcg gttaaatcat 540  
aaaattccga ttgtcgatga agttgctatg attgacaaag ttccgttaaa tatgctggca 600  
gctgtagaag ttgctggccc tggacaagta atttcacaac tttcaaaccg gtatggtac 660  
gctaccttat ttggactaac tccagaagag actaagaata ttgttccagt ttctcgagcg 720  
cttattggaa atcggtcgcc tggatgttatt aagactccag ctggggatgt taaagcgcga 780  
gtaattccag caggtaaaat cataatTAAT ggtgataactg gaaaagaaga agttggagtt 840  
tctgaagggtg ctgacgccc tatgaaaaag gtttctagtt tccgcccata taacaatata 900  
actggtgagt ctggAACCAA tggatggagga atgttggaaa atgttgcgtca aacaatggca 960  
gatcttacag gaaagaaaaa tggatggaaaatt gctattcaag atttacttgc tggatgtact 1020  
caagtaccag ttgaagttcg aggccgtcta gctggtgaat tctcaaATGA atcagcagtt 1080  
gggatcgccag caatggttaa gtcagatcat cttcaaATGG aagttattgc taaacttatt 1140  
gaaaaagaat ttaatacAAA ggTTGAAATT ggtggtgctg aagttgaatc tgcaattcgt 1200  
ggagcattaa caactccagg aacagataag ccaatcgcaa tccttgattt aggtgctggc 1260  
tcaacagatg cttcaatcat taataaagaa aataatacag ttgcaattca cttagctggt 1320  
gctggtgata tggtAACGAT gattattaat tctgaattAG gattGAATGA tattcatctt 1380  
gcagaagaca tcaaACGCTA cccattAGCA aaggtagaaa accttttca aattcgacat 1440  
gaggatggtt cggttcaatt ctTTAAAGAT ccgcttccat catcaCTGTT tgccaaAGTT 1500

<210> 21  
<211> 615  
<212> PRT  
<213> *Lactobacillus reuteri*

<4 0 0> 21

Met Ala Thr Glu Lys Val Ile Gly Val Asp Ile Gly Asn Ser Ser Thr  
 1 5 10 15

Glu Val Ala Leu Ala Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Ile Asn Phe Ile  
 20 25 30

Gly Ser Gly Ile Ala Pro Thr Thr Gly Ile Lys Gly Thr Lys Gln Asn  
 35 40 45

Leu Val Gly Ile Arg Asp Ser Ile Asn Gln Val Leu Asn Lys Ala Asn  
 50 55 60

Leu Thr Ile Asn Asp Ile Asp Leu Ile Arg Ile Asn Glu Ala Thr Pro  
65 70 75 80

Val Ile Gly Asp Val Ala Met Glu Thr Ile Thr Glu Thr Val Val Thr  
 85 90 95

Glu Ser Thr Met Ile Gly His Asn Pro Asp Thr Pro Gly Gly Ile Gly  
 100 105 110

Thr Gly Ala Gly Ile Thr Val Arg Leu Leu Asp Leu Val Lys Lys Thr  
 115 120 125

Asp Lys Ser Gln Asn Tyr Ile Val Val Val Pro Lys Asp Ile Asp Phe  
130 135 140

Glu Asp Val Ala Lys Leu Ile Asn Ala Tyr Val Ala Ser Gly Tyr Lys  
145 150 155 160

Ile Thr Ala Ala Ile Leu Lys Asn Asp Asp Gly Val Leu Val Asp Asn  
165 170 175

Arg Leu Asn Lys Pro Ile Pro Ile Val Asp Glu Val Ala Met Ile Asp  
180 185 190

Lys Val Pro Leu Asn Met Leu Ala Ala Val Glu Val Ala Gly Ser Gly  
195 200 205

Gln Val Ile Ser Gln Leu Ser Asn Pro Tyr Gly Ile Ala Thr Leu Phe  
210 215 220

Gly Leu Asn Pro Glu Glu Thr Lys Asn Ile Val Pro Val Ser Arg Ala  
225 230 235 240

Leu Ile Gly Asn Arg Ser Ala Val Val Ile Lys Thr Pro Ala Gly Asp  
245 250 255

Val Lys Ala Arg Val Ile Pro Ala Gly Asn Ile Ile Ile Asn Ser Asp  
260 265 270

Thr Gly Lys Glu Glu Val Gly Val Ser Glu Gly Ala Asp Ala Ile Met  
275 280 285

Lys Lys Val Ser Ser Phe Arg His Ile Asn Asp Ile Thr Gly Glu Ser  
290 295 300

Gly Thr Asn Val Gly Gly Met Leu Glu Asn Val Arg Gln Thr Met Ala  
305 310 315 320

Asp Leu Thr Gly Lys Lys Asn Ser Glu Ile Ala Ile Gln Asp Leu Leu  
325 330 335

Ala Val Asp Thr Gln Val Pro Val Glu Val Arg Gly Gly Leu Ala Gly  
340 345 350

Glu Phe Ser Asn Glu Ser Ala Val Gly Ile Ala Ala Met Val Lys Ser  
355 360 365

Asp His Leu Gln Met Glu Val Ile Ala Lys Leu Ile Glu Asp Glu Phe  
370 375 380

His Thr Lys Val Glu Ile Gly Gly Ala Glu Val Glu Ser Ala Ile Arg  
385 390 395 400

Gly Ala Leu Thr Thr Pro Gly Thr Asp Lys Pro Ile Ala Ile Leu Asp  
405 410 415

Leu Gly Ala Gly Ser Thr Asp Ala Ser Ile Ile Asn Lys Glu Asn Gln  
420 425 430

Thr Val Ala Ile His Leu Ala Gly Ala Gly Asp Met Val Thr Met Ile  
435 440 445

Ile Asn Ser Glu Leu Gly Leu Asn Asp Ile His Leu Ala Glu Asp Ile  
450 455 460

Lys Arg Tyr Pro Leu Ala Lys Val Glu Asn Leu Phe Gln Ile Arg His  
465 470 475 480

Glu Asp Gly Ser Val Gln Phe Phe Glu Asp Pro Leu Pro Ser Ser Leu  
485 490 495

Phe Ala Arg Val Val Val Ile Lys Pro Asp Gly Tyr Glu Pro Val Thr  
500 505 510

Gly Asn Pro Ser Ile Glu Lys Ile Lys Leu Val Arg Gln Ser Ala Lys  
515 520 525

Lys Arg Val Phe Val Thr Asn Ala Leu Arg Ala Leu Lys Tyr Val Ser  
530 535 540

Pro Thr Gly Asn Ile Arg Asp Ile Pro Phe Val Val Ile Val Gly Gly  
545 550 555 560

Ser Ala Leu Asp Phe Glu Ile Pro Gln Leu Val Thr Asp Glu Leu Ala  
565 570 575

His Phe Asn Leu Val Ala Gly Arg Gly Asn Val Arg Gly Val Glu Gly  
580 585 590

Pro Arg Asn Ala Val Ala Thr Gly Leu Ile Leu Arg Tyr Gly Glu Glu  
595 600 605

Arg Arg Lys Gln Tyr Glu Gln  
610 615

<210> 22  
<211> 1848  
<212> DNA  
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 22  
atggcaactg aaaaagtaat tgggtgttgc attggtaatt cttccactga agtagcgtta 60  
gctgatgttg ctgataatgg aacaattdac tttattggct ctggaatagc ccctactact 120  
ggtatcaagg gtacaaaaaca aaatctggtt ggaatttagag attccatcaa tcaagtcctt 180  
aataaggcta atttaacgat taatgatatt gatTTAATTc ggattaaatga ggcaacgcca 240  
gttatcggtg acgttagcgat ggaaacaatt accgaaacgg tcgtAACCGA atcgactatg 300  
atcggacata atcctgatac tcccgggtggt attggaaactg gtgcaggaat aacagttaga 360  
ctattggatc ttgtcaaaaa gacggataaa agtcaaaact atattgttgt tgTTCCCAAG 420  
gatattgatt ttgaagatgt tgctaaactg attaacgcct atgttgcttc gggctataag 480  
attacagctg cgatcctaaa aaatgatgat ggtgtgttag ttgataatcg attgaataaa 540

ccaattccga ttgttcatga agttgccatg attgataaag tcccattaaa tatgctggcg 600  
gcagttgaag ttgctggttc gggacaagtt atctcgcaac tttcaaattcc atatggatt 660  
gctaccttgt ttggattgaa tccagaagaa accaagaata ttgttctgt ctcacgtgca 720  
cttattggta accgttctgc cgttgtcatt aagacaccag cagggatgt taaggcacgg 780  
gtaattccag ccgaaacat tatcattaac agcgataaccg gaaaagaaga agttggtgtt 840  
tcagaagggtg ctgacgcccattatgaagaaa gtttccagtt tccgtcacat taatgatatt 900  
actggagaat cagggactaa cggtggtgga atgcttgaaa atgttgcaca aacaatggct 960  
gatttaactg gaaagaagaa tagtgaattt gctattcaag atctattagc ggtagataca 1020  
caggtgcctg tcgaagttcg cggggcttg gctggtaat tttcaaattga atcagcagtt 1080  
ggtattgctg cgatggtaa gtctgatcat cttcaaattgg aagtaattgc taaattaatt 1140  
gaggatgaat tccatacgaa gggtgagatt gggtggtgccg aagttgaatc tgcaattcgc 1200  
ggtgcatattaa cgacaccggg aacagataaa ccaattgcaa ttcttgattt aggtgcggc 1260  
tcaacagatg cttcaattat caataaagaa aatcaaactg tagcaattca cttagctgg 1320  
gctggtgaca tggttacgat gattattaac tctgaattgg gattaaatga cattcacttg 1380  
gcagaggata ttaagcgcta tccattagct aaagtcgaaa atctattcca aattcgtcat 1440  
gaagatggat cggtacaatt ctttgaagat ccgttccgt catcattatt tgctcgtgtt 1500  
gttgtaatca aaccagatgg gtatgaaccg gttacggta atccaagcat tgagaagatc 1560  
aagctggttc gtcaaagtgc taagaagcgg gtatttgtaa ccaatgcatt acgagctctt 1620  
aagtacgtca gcccggacagg aaacattcgt gatattccgt ttgttgtat tgcgggtgga 1680  
tctgctcttg actttgaat accacaactg gtaacagatg agtttagcaca ctttaactta 1740  
gttgccggac gtggaaatgt tcgtggagta gaaggccac gaaacgcggc tgcaacagga 1800  
ttaattctcc gttatggcga agaaagaaga aagcaatatg aacaatga 1848

<210> 23  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 23

Met Asn Asn Asp Asp Ser Gln Arg Pro Ser Ile Val Val Gly Leu Glu  
1 5 10 15

Asn Gly Ile Thr Ile Pro Asp Ser Val Lys Pro Leu Phe Tyr Gly Ile  
20 25 30

Gl u Gl u Gl u Gln Ile Pro Val Ser Val Arg Lys Ile Asn Ile Asn Asp  
35 40 45

Thr Val Glu Arg Ala Tyr Gln Ser Ala Leu Ala Ser Arg Leu Ser Val  
50 55 60

Gly Ile Ala Phe Glu Gly Asp His Phe Ile Val His Tyr Lys Asn Leu  
65 70 75 80

Lys Glu Asn Gln Pro Leu Phe Asp Met Thr Ile Asn Asp Lys Lys Gln  
85 90 95

Leu Arg Ile Leu Gly Ala Asn Ala Ala Arg Leu Val Lys Gly Ile Pro  
100 105 110

Phe Lys Glu Met Ala Asn Arg  
115

<210> 24

<211> 360

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 24

atgaacaacg atgattcaca acgtccctcg attgtcgctcg gactagaaaa tggataacg 60

attccagata gtgtcaagcc actttttat ggaattgaag aagaacagat cccagtcata 120

gttcgtaaaa tcaatataaa tgatactgtt gaaagagcat accaatcagc tcttgcata 180

aggctatctg taggaattgc ttttgaagga gatcattttta ttgttcacta taagaactta 240

aaagaaaaatc agcctttatt tgatatgaca atcaatgata aaaagcaatt acgaatttta 300

g gag caa atg c a g c g a g a t t a g t a a a a g g a a t c c c t t t a a g g a a t g g c a a a c a g g t g a 360

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 25

Met Asn Asn Asp Ser Glu Arg Pro Ser Ile Ile Val Gly Val Glu Asn  
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ile Pro Gln Asn Ala Ala Pro Leu Phe Asn Gly Ile Glu  
20 25 30

Glu Glu Gln Ile Pro Val Ala Val Arg Glu Ile Asp Ile Asp Asn Val  
35 40 45

Leu Ser Arg Ala Tyr Gln Ser Ala Leu Ala Ser Arg Leu Ser Val Gly  
50 55 60

Ile Ala Phe Asp Gly Asp Arg Phe Ile Val His Tyr Lys Asn Leu Lys  
65 70 75 80

Glu Asn Lys Pro Leu Phe Asp Lys Thr Ile Ser Asp Gly Lys Gln Leu  
85 90 95

Arg Val Leu Gly Ala Asn Ala Ala Arg Leu Val Lys Gly Ile Pro Phe  
100 105 110

Lys Glu Met Val Asn Arg  
115

<210> 26

<211> 357

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 26

atgaacaatg attcagagcg tccctcaatt atcgtaggtg ttgagaatgg aacagctatt 60

cctcaaaatg cagcaccgct ttttaacgga attgaagaag aacaaaatacc ggtggcggtt 120  
agagaaaatcg acattgataa tgtttaagt cgggcatacc agtcggccct cgccctcacga 180  
ttatcagtag ggattgcttt tgatggtgat cgatttatacg ttcaactataa aaacttaaaa 240  
gaaaacaaac cactatttga taaaacaatt agtgatggta agcaactacg agttctagga 300  
gcaaatgcag cgcgactagt aaaggaaatc ccctttaagg aaatggtaaa caggtga 357

<210> 27  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 27  
atgaaaacgtc aaaaacgatt tgaagaacta gaaaaaac 37

<210> 28  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 28  
ttagttatcg cccttagct tcttacgact tt 32

<210> 29  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 29  
atgaaaacgtc aaaaacgttt tgaagaacta 30

<210> 30  
<211> 25  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 30

c t a g t t a t c a c c c t t g a g c t t c t t t

25

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 31

a t g g g a g g c a t a a t t c c a a t g g a a a a a t a

29

<210> 32

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 32

t t a a c g a a t t a t t g c t t c g t a a a c c a t c t t c

31

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 33

a t g g g a g g c a t a a t g c c g a t g

21

<210> 34

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 34

ttaacgaatt attgcttcgt aatatcatctt c

31

<210> 35

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 35

atgaatagac aatttgatcc cttaatgcctt ag

32

<210> 36

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 36

ttagtagatg ccatcgtaag cctttt

26

<210> 37

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 37

atggcaactg aaaaagtaat tggtggttcat att

33

<210> 38

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 38  
tcacctgttt gccatttcct taaaaggat t

31

<210> 39  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 39  
atggcaactg aaaaagtaat tggtgttg 28

<210> 40  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 40  
tcacctgttt accatttcct taaagg 26

<210> 41  
<211> 477  
<212> PRT  
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 41

Met Gln Ile Asn Asp Ile Glu Ser Ala Val Arg Lys Ile Leu Ala Glu  
1 5 10 15

Glu Leu Asp Asn Ala Ser Ser Ser Ala Asn Val Ala Ala Thr Thr  
20 25 30

Asp Asn Gly His Arg Gly Ile Phe Thr Asn Val Asn Asp Ala Ile Ala  
35 40 45

Ala Ala Lys Ala Ala Gln Glu Ile Tyr Arg Asp Lys Pro Ile Ala Val  
50 55 60

Arg Gln Gln Val Ile Asp Ala Ile Lys Glu Gly Phe Arg Pro Tyr Ile  
65 70 75 80

Glu Lys Met Ala Lys Asp Ile Lys Glu Glu Thr Gly Met Gly Thr Val  
85 90 95

Glu Ala Lys Ile Ala Lys Leu Asn Asn Ala Leu Tyr Asn Thr Pro Gly  
100 105 110

Pro Glu Ile Leu Glu Pro Val Val Glu Asn Gly Asp Gly Gly Met Val  
115 120 125

Met Tyr Glu Arg Leu Pro Tyr Gly Val Ile Gly Ala Val Gly Pro Ser  
130 135 140

Thr Asn Pro Ser Glu Thr Val Ile Ala Asn Ala Ile Met Met Leu Ala  
145 150 155 160

Gly Gly Asn Thr Leu Tyr Phe Gly Ala His Pro Gly Ala Lys Asn Val  
165 170 175

Thr Arg Trp Thr Ile Glu Lys Met Asn Asp Phe Ile Ala Asp Ala Thr  
180 185 190

Gly Leu His Asn Leu Val Val Ser Ile Glu Thr Pro Thr Ile Glu Ser  
195 200 205

Val Gln Gln Met Met Lys His Pro Asp Ile Ala Met Leu Ala Val Thr  
210 215 220

Gly Gly Pro Ala Val Val His Gln Ala Met Thr Ser Gly Lys Lys Ala  
225 230 235 240

Val Gly Ala Gly Pro Gly Asn Pro Pro Ala Met Val Asp Ala Thr Ala  
245 250 255

Asp Ile Asp Leu Ala Ala His Asn Ile Ile Thr Ser Ala Ser Phe Asp  
260 265 270

Asn Asp Ile Leu Cys Thr Ala Glu Lys Glu Val Val Ala Glu Ser Ser  
275 280 285

Ile Lys Asp Glu Leu Ile Arg Lys Met Gln Asp Glu Gly Ala Phe Val  
290 295 300

Val Asn Arg Glu Gln Ala Asp Lys Leu Ala Asp Met Cys Ile Gln Glu  
305 310 315 320

Asn Gly Ala Pro Asp Arg Lys Phe Val Gly Lys Asp Ala Thr Tyr Ile  
325 330 335

Leu Asp Gln Ala Asn Ile Pro Tyr Thr Gly His Pro Val Glu Ile Ile  
340 345 350

Cys Glu Leu Pro Lys Glu His Pro Leu Val Met Thr Glu Met Leu Met  
355 360 365

Pro Ile Leu Pro Val Val Ser Cys Pro Thr Phe Asp Asp Val Leu Lys  
370 375 380

Thr Ala Val Glu Val Glu Lys Gly Asn His His Thr Ala Thr Ile His  
385 390 395 400

Ser Asn Asn Leu Lys His Ile Asn Asn Ala Ala His Arg Met Gln Cys  
405 410 415

Ser Ile Phe Val Val Asn Gly Pro Ser Tyr Val Gly Thr Gly Val Ala  
420 425 430

Asp Asn Gly Ala His Ser Gly Ala Ser Ala Leu Thr Ile Ala Thr Pro  
435 440 445

Thr Gly Glu Gly Thr Cys Thr Ala Arg Thr Phe Thr Arg Arg Val Arg  
450 455 460

Leu Asn Ser Pro Gln Gly Phe Ser Val Arg Asn Trp Tyr  
465 470 475

<210> 42  
<211> 1434  
<212> DNA  
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 42  
atgcagat ta atgatattga aagtgcgtga cgcaaaattc ttgccgaaga actagataat 60  
gccagctctt caagtgc当地 cggtgcagct actactgata atggtc当地 cggaattttc 120  
actaatgtca atgatgcaat tgctgctgca aaagctgctc aagaaaatata tcgggataag 180  
ccaattgctg ttgc当地aca agtgattgat gccatttaagg aaggattc当地 cccatataatt 240  
gaaaaatgg ctaaagat at caaagaagaa acaggaatgg gaacagtaga ggccaaaatt 300  
gctaagttaa acaatgc当地 gtacaacact cctggtcccg agattcttga accagttgt 360  
gaaaacggtg acggtgggat ggttatgtat gaacggttac catatggtgt tattggtgcg 420  
gttggcccaa gtacaaaccc ttcaaaaact gtaattgcta atgc当地cat gatgcttgc 480  
ggtgttaata ctcttactt tggtgctcac cctggcgcaa agaatgttac tc当地ggaca 540  
attgaaaaga tgaacgat tt tattgcagat gcaacaggcc tt当地ataattt agttgt 600  
attgaaaacac caacaattga atcagttcaa caaatgatga agcaccggca cattgcaatg 660  
tttagcagtaa ctgggtggccc agctgttgtt caccaagcaa tgaccagtagg taagaaagcg 720  
gttggtgctg gtc当地ggtaa tc当地ctgca atggttgatg ctactgctga tattgat 780  
gctgctcata atatcattac atctgcttca tttgataatg atatttatg tactgctgaa 840  
aaggaagtat ttgc当地aaag tagcattaaa gatgaattaa tt当地taagat gcaagatgaa 900  
ggtgcccttg tagttaccg tgaacaagcc gataaattag ctgatatgtg tatccaagaa 960  
aatggtgctc ctgatcgtaa atttgttggt aaggatgcaa ct当地atctt agaccaagct 1020  
aatatccctt acacaggcca cccagttgaa attatttgtg aacttcccaa ggaacatcca 1080  
tttagtaatga ctgaaatgtt aatgccaatt ttaccagttg tt当地tgc当地 aacat 1140

gatgttttga agactgctgt tgaagttgaa aaaggtaacc atcacacagc tactattcat 1200  
tccaataacc ttaagcatat taataatgct gctcaccgga tgcaatgttc aatctttgtt 1260  
gttaatggcc catcctatgt tggtacaggt gttgcagata atggagctca ctcaggtgct 1320  
tcagcattaa caattgctac gccaaactggt gaaggaacat gtactgcacg aacatttact 1380  
cgtcgggttc gtttgaactc accacaagga ttctcagtagc gtaactggta tttaa 1434

<210> 43  
<211> 395  
<212> PRT  
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 43

Met Met Ser Lys Lys Ile Leu Ala Ile Asn Ser Gly Ser Ser Ser Ile  
1 5 10 15

Lys Phe Lys Leu Tyr Leu Met Pro Glu Glu Lys Leu Leu Ile Ser Gly  
20 25 30

Ser Ala Glu Asn Leu Gly Ser Ser Thr Ser Gln Leu Ser Tyr Lys Thr  
35 40 45

Asp Lys Thr Asn Glu Thr Arg Gln Ile Pro Leu Lys Asn His Ser Glu  
50 55 60

Ala Ile Asp His Ile Ile Asp Val Leu Met Ser Ser Gly Val Val Lys  
65 70 75 80

Asp Lys Ser Glu Ile Tyr Gly Val Gly His Arg Ile Ser His Gly Gly  
85 90 95

Ser Tyr Tyr Thr His Ala Val Ala Val Thr Pro Glu Val Glu Lys Arg  
100 105 110

Ile Asp Glu Leu Lys Val Leu Ser Pro Leu His Asn Pro Asn Gly Leu  
115 120 125

Ala Gly Ile Lys Ala Phe Glu Lys Phe Leu Pro Asp Ala Lys Glu Val  
130 135 140

Val Thr Phe Asp Asn Ser Phe His His Thr Ile Pro Lys Lys Ala Tyr  
145 150 155 160

Met Tyr Ala Leu Pro Tyr Glu Phe Tyr Glu Lys Tyr Gln Ile Arg Arg  
165 170 175

Tyr Gly Phe His Ala Pro Ser His Gln Tyr Val Ser Glu Lys Ala Arg  
180 185 190

Glu Leu Phe Gly Lys Glu Lys Thr Arg Arg Met Ile Thr Cys His Leu  
195 200 205

Gly Asn Gly Ser Ser Val Ser Ala Ile Leu Asp Gly Lys Ser Val Asn  
210 215 220

Ser Ser Met Gly Phe Thr Pro Leu Ala Gly Val Val Met Gly Thr Arg  
225 230 235 240

Cys Gly Asp Ile Asp Pro Glu Ile Ile Pro Phe Leu Glu Glu Glu Leu  
245 250 255

Asn Ile Asp Ser His Glu Met Arg Arg Ile Met Asn Glu Asp Ser Gly  
260 265 270

Leu Lys Gly Leu Ser Gly Ile Ser Asn Asp Glu Arg Glu Ile Glu Ser  
275 280 285

Ala Ala Lys Asn Gly Asn Glu Arg Ala Gln Leu Ala Leu Asp Val Phe  
290 295 300

Val His Ser Ile Gln Gln Tyr Ile Gly Ala Tyr Thr Thr Asp Leu Asp  
305 310 315 320

Gly Leu Asp Thr Leu Val Phe Thr Ala Gly Ile Gly Glu His Ala Ala  
325 330 335

Tyr Ile Arg Ser Gln Ile Cys Lys Asn Leu Asp Tyr Leu Gly Val Lys  
340 345 350

Ile Asp Glu Glu Lys Asn Lys Asn Asn Glu Leu Ser Ile Glu Ala Pro  
355 360 365

Asp Ser Lys Val Lys Ile Ala Val Ile Pro Thr Asn Glu Glu Ile Ile  
370 375 380

Ile Ala Arg Asp Val Met Asn Val Thr Gln Gln  
385 390 395

<210> 44

<211> 1188

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 44

ttgatgtcaa aaaaaatact tgcaatataat tctggtagtt catcaattaa gttcaaactt 60

tacttgatgc cagaggagaa actattaatt agtggttctg ctgaaaatct tggttcttcg 120

acaagtcagc tttcatataa aactgataaa actaacgaga caagacaaat ccctttaaaa 180

aaccactcag aggcaattga ccatattatt gatgtttaa tgtctagtg ggttgttaag 240

gataagtcag aaatttatgg tggatgtcac cggatttctc atggcggaaat ttactatact 300

catgcagttgg cagtcaactcc agaagttgaa aaacggattt atgaatttggaa ggtgttatca 360

cctctgcata atccaaatgg actagcaggg ataaaagcct ttgaaaagtt tcttccagat 420

gcgaaggaaat tagttacttt cgataattca tttcatcata caatccctaa gaaagcttat 480

atgtatgctt tgccatatga gtttatgaa aagtatcaaa ttagggcgta cgggttccat 540

gccccttcac atcagtatgt gtcagaaaaa gcgcgtgaac tttttggtaa agaaaagact 600

cgtcgatatga tcacgtgtca tttggaaat ggatcaagcg tttcggcgat cttagatgga 660

aagtccgtta actcttcaat gggcttact ccgttagcag gtgttagttagt gggaaacgcga 720

tgtggagata ttgatccaga aattattcct tttcttgaag aagaactcaa tattgattca 780

catgaaatgc gtgcgataat gaatgaagac tcagggctta aaggcttatac tgggatttct 840  
aatgatgaac gtgagattga aagtgcggct aaaaacggta acgaacgggc acaatttagct 900  
ttagatgtat ttgtacattc aattcaacaa tatattggag catataacaac ggatcttgat 960  
gatttggata cattagtatt tacagccgga attggtaac atgctgctta tattagaagt 1020  
cagatctgta agaatttaga ctatcttggaa gtcaaaatttgc acgaagagaa aaataaaaat 1080  
aatgagctaa gcattgaagc acctgatagt aaggtaaaaa tagctgttat tccaaactaac 1140  
gaagaaataa ttattgcccc tgatgtaatg aatgtaaactc agcaataaa 1188

<210> 45  
<211> 1122  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 45  
atggttgaag aatttggctc accatcgct tacatccaag gaaaagggtgt cctttttgaa 60  
agtgataagt atcttaaaaa ctttggcaca aaaccgttat tattggctgg cgaaacagtc 120  
tataaaatttgc taggttaagcg ttttgaacag tatcttcaag aaagtggtaa tgatgtcacc 180  
cggttcaat ttaatggtga atcatccact aacgaagtaa accgggttac agaaatttgg 240  
aaagaaaaata atgtaaactgt cgtttatggt cttggtggtg gtaaaaacagt tgataccgccc 300  
aaagcaatttgc cggacaatcttccatcttacca gttgttaatttgc tgccaaacatttgc 360  
gatgcacccttt gttctcgctt ttcagtaatc tacactgtatc acgggtggctt cgatcattat 420  
cgtttctaca accaaaaaccc taatctggttt ttagttgata ctcaagttat cgctaattgg 480  
cccggttgcga tgcttatttc tggaatttgct gatgcttttagt ctaccaatgt tgaggcacaa 540  
gcagttgcgc aagctcatag tgatacaatg cttggtgaaa aacaaaccct tggatggaaat 600  
gcaatcgccc agaaatgtga agagacatttgc tttaattact cgcacccatgc tggatgtat 660  
gcagaaaaaccc atgtcgttac accagcattt tctaataatttgc ttgaagcaaa tacactaatg 720  
agcggtctcg gttttgaaatggtggtctatc tctgggtggcc acgctattca tgatggctta 780  
acaattttag aagagactca tgatccaacacacggtgaaa aggtcgacata cggtacccat 840  
acacaattaa tggtggaaagg cgctgaccag gaacgctata acaagttactt ccaatttattt 900

ctttctttag gccttaccaac tactcttgct gatctacatt tagaaaatgt caccgatgaa 960

gaactgctca atgctggaaa agccgcgtgt tcagaacaag ataccatgga tcgtttgcca 1020

ttaaaggtaa ctccagatga cgttgctcaa gcattacgag cagttgatgc atatactaaa 1080

caatatttaa ctaatcatcg ttgtcaccat agtcgtatgt aa 1122

<210> 46

<211> 1021

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> recombinant DNA

<400> 46

gataagacgg ttctgtttcg tgctgacttg caccatataca taaaaatcga aacagcaaag 60

aatggcgaaa acgtaaaaga agttatggaa ataagactta gaagcaaact taagagtg 120

ttgatagtgc agtatcttaa aatttgtat aataggattt gaagttaaat tagatgctaa 180

aaatttgtaa ttaagaagga gtgattacat gaacaaaaat ataaaatattt ctcaaaactt 240

tttaacgagt gaaaaagtac tcaaccaaattt aataaaaacaa ttgaattttaa aagaaaaccga 300

taccgtttac gaaattggaa caggtaaagg gcatttaacg acgaaactgg ctaaaataag 360

taaacaggta acgtctattt aatttagacag tcatctattt aacttatacgt cagaaaaattt 420

aaaactgaat actcggtgtca cttaatttca ccaagatattt ctacagtttc aattccctaa 480

caaacagagg tataaaattt ttgggagttat tccttaccat ttaagcacac aaatttattaa 540

aaaagtggtt tttgaaagcc atgcgtctga catctatctg attgttgaag aaggattctt 600

caagcgtacc ttggatattt accgaacact agggttgtc ttgcacaccc aagtcgtat 660

ttagcaattt cttaagctgc cagcggaaatg ctttcatcctt aaacccaaag taaacagttgt 720

cttaataaaa cttaccggcc ataccacaga tttccagat aaatatttggaa agctatatac 780

gtactttgtt tcaaaaatggg tcaatcgaga atatcgtaa ctgtttacta aaaatcagtt 840

tcatcaagca atgaaacacg ccaaagtaaa caatttaagt accgttactt atgagcaagt 900

attgtctattt tttatagtt atctattttt taacggagg aaataattct atgagtcgt 960

tttgtaaatt tggaaagtta cacgttacta aaggaaatgt agataaattta ttaggtatac 1020

t 1021

<210> 47

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 47

atgcagat ta atgatattga aagtgc t gta 30

<210> 48

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 48

ttaataccag ttacgtactg agaattcc 27

<210> 49

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 49

ttgatgtcaa aaaaaatact tgcaattat tctg 34

<210> 50

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 50  
ttattgctga gttacattca ttacatcac 29

<210> 51  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 51  
atggttgaag aatttggctc acc 23

<210> 52  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 52  
ttacatacga ctatggtgac aacg 24

<210> 53  
<211> 19860  
<212> DNA  
<213> Lactobacillus reuteri

<400> 53  
tttttgtgta ttaatttgta aaatattgcc gttattgaac agttaatcca ataaagacaa 60

taaaatacat aattaatgtg tttagcattat atgtatagaa aacgcataca atttggaaat 120

aatataaaaa ggttggtggt tagacatgca tggatttatt ggcgaatttt ttggcaccat 180

ggttttaatc ctattaggag caggatgtg tgctggtaat agtttgaata aaacatatgg 240

gaaacaaagt ggctggtggt ttatctgtat ttcatggggc ttagcagttt caatggagtt 300

ttatgttgca ggatttctgg gttcattagg gcacttaat cccgctgtaa caattcccttt 360

tgctattttt ggcttattcc catggagtaa cgttataacct tacttacttg gtcaatttct 420

tggtgcggtt gttggtgca g tattagtaat tattcaattc tatccacaat ttaaagcaac 480

cccaaatgaa gaagaaggaa ataatgttgg tattttgct actcgccag cgataaatag 540  
tccaattttt aacttttct cagaagtgtat tgcgaccctt gcatttattt tcattttattt 600  
aaatcttgc aacttacac agggattgaa gccatttac gtaggaatgg ttattgcagt 660  
tgggttaca tgtctcgga caactactgg ctttgcatta aacccagctc gtgattggc 720  
accacgttta gcataacta ttttgc当地 tcctaataag ggtgtttcag aatgggtgta 780  
tgc当地gggtt ccaatgtgtg gccc当地attgt tgggggc当地t cttgcttgc当地t ctttacaaaac 840  
ggcactagtt tagtgaacct agagaaaagg aggctaaatta atatagcctc tttattttagt 900  
ttaaataaaa tatgaaatat ct当地gttggag aaaattaatg aaaaaagaat ttttaaaaag 960  
tagtaatgaa caattaaaaa aatttccga gattgttaat gggataagc ct当地tacgtaa 1020  
agttacggct gatgaaaagc taaaggctgg ttagatatta ggaacttctt caattgtttt 1080  
aacagtgctg gattccaaag ataagattgt atacggagcg tatgaaatatg accatgcagt 1140  
tcaagatggt attgttagtta atttcatgga atcagttat attttaagac gcttaaaaaga 1200  
aaaagctgag aaagtattag gacgtgaact taaaacggca tgggtgctt ttccaccgaa 1260  
gacaggagag aagagtgc当地 aagtgggtgc taatgttac gaaagagacag gcttgc当地t 1320  
tacaggtgtt gaagatgaaac cgacagcagc tgc当地agttc ttaagattgt caaatggta 1380  
agttgttagat attggaggag gaacaactgg gatttagtatt tt当地aaagata acaagctcat 1440  
ccatgttattt gatgaaagcaa caggcggatt tcatatgacg ct当地gttctt gaggaaagata 1500  
taaaataaaa aatgatgaaag cagaaaaatt aaagcgtaac aagaataaaag aatctgaagt 1560  
atatgctgtt attaaacctg tagttgagaa aatggcagca attgttcaaa atatggaggt 1620  
agaaattattt gatccagtaa tagtgggtggg aggtgcaact aactttactg aatttacaac 1680  
aaccttttagt aaagatttaa agcgtaaagt ttataaaccg ct当地tacctc aatttgttac 1740  
gccactagg attgcaatgt ttgatgatta gaataaataa gaggctggc acccccaacc 1800  
tcttttaat tt当地aaataat tt当地ttagta taaatccatt gaattactga acgatcaa 1860  
acattaatct cactagctgg aataataggt tgagaacaat ctactgtata gacccaaac 1920  
gc当地tattac taacatcatt cagatcattt attgaataga tatatggata cccat 1980

tcacgggctt taaagggaaat atcattttta ttgaaaaat ctttgagat ttcataaaacg 2040  
gacttatttg agcgccattg taaatctctt ggaatagtgat agatttctt tattgcggaa 2100  
ttatattttc gatactttga tgggtgcatt cctactttt gcttggaaat tttagtaaag 2160  
taacttgtct gtggaaaaacc aacttgcatttgc caattttat taatttgtgt atttgaaaaa 2220  
attaaatttt cttgagcaag tgcaattttt ttagattttataatgatataat aaaaattgtca 2280  
ttaaaataat ttttaaagat tcgacttaag tatgtatggtg agagataaaat ctttgagaa 2340  
acgttttcta aagtaagcgttttctaaa ttggattaa tgtatTTAAG cgccatggtt 2400  
atattttttt caatatcact tagagtacca tcatttctgt tattaaatggatataatggat 2460  
gtaacgttag ctattgaatc atctccagaa atattcaaaa tcccatTTAAG gactttgatt 2520  
agtgaactta gcttaggagc ctcgaatggg gtaaggacag ctatgcagtc attggaaactg 2580  
tcaataaaat ttttgcaga aatttcaata tatttactac ataaatcaat agcgtctgat 2640  
tctatatgtt attcatcaag aacaaagaaa ccactttaag atgagcttataactatgtt 2700  
aaaacaaagt aatttttaaa atcgagtttt cgttaatgtt caagtggaaat atttgagttca 2760  
aaaagaaggg tggcaatc aacaattgct ccggtaatgc ttgtggaaat tatatttattt 2820  
ttggttatTTT cctggaaatgt tttgttacc ttttggatgt cattcaagaa ttttggaaat 2880  
tattcgataca tttggatTTT gcctactttt taccaaaatTTT tttaagggaaat atggcgTTT 2940  
ccctctatata ttagcataaca tttacacata aaaacgcttt cctgtaaatt ttgtgataca 3000  
taataataaa ttattgttct ttttaagtgat cttacatTTT ttaagataat atatcataaaa 3060  
tatcatgtta taaaatTTAAC atgtaccaaa ttgtggatgc tttctcatttttgcgttatttt 3120  
tttttataact taggaggcat tctttagggaa caagaaggcac ttggTTTat tgaaaccggaa 3180  
ggactttgttag cttcaatttga agctgcgtat gcaatggtaa aagctgctaa tgTTTaaatTTT 3240  
attgggtcaag aaaagattgg tcatggatTTT gtcacagtaa tggTTTGTGG tgatgttggaa 3300  
gctgtttaagg cttcagttga tgccggagta caagctgccc aaaaatattgg agaagttgtt 3360  
tcgagttacg taattcctcg tcctcaatctt gaaatggata agctcttacc gcatcatggaa 3420  
gaataattga taaaaatTTT aagcccttat acagacggct aggtacagaa atctgttatttt 3480

agagctttat tgtaagagc tttatagtc aggaggaaaa ataatgaatg atttctgaa 3540  
ttctactagt actgttccag aatttgggtgg tgcttagcgaa attggagata ccattggaaat 3600  
ggtaattccg agagttgate aacaactatt agataaattt cacgttacaa aacaatacaa 3660  
gacttttaggt attttagtg atcgtaactgg tgctggtcca caaattatgg caatggatga 3720  
aggaatthaag gctactaaca tggaatgtat tgatgttcaa tggccacgtg atactaaagg 3780  
tggaggaggc catggatgtt taattatcat cggtggtgat gatcctgcag atgcacgcca 3840  
agctattcgg gttgcacttg ataatcttca tcgtacatgg ggtgacggtt ataacgcca 3900  
agcgggtcac cttgaattac aatttacagc tcgtgctgca ggtgctgcac atcttggatt 3960  
aggtgcagtt gaagggaaag catttgggtt gatttgggt tgcccttccg ggattgggt 4020  
cgtgatggga gataaggctt taaagactgc tggtggttcaa ccgcttaact ttacttcacc 4080  
aagtcatggt acaagtttct ctaacgaagg ttgcctaact attaccggtg actcaggagc 4140  
tggtcgtaa gctgttatgg ctggacgtga agtaggatta aagttattgt cacagtttgg 4200  
tgaagaacca gttaatgatt tcccatcata cattaagtag atctagaagg aggactactt 4260  
tattatgaaa cgtcaaaaac gatttgaaga actagaaaaa cggccaaatc atcaagatac 4320  
atttgttaaa gaatggccag aagaagggtt cggtgcaatg atggggccta atgaccctaa 4380  
gcctagtgta aaagttgaaa atggcaagat cgttagagatg gatggtaaaa agctcgaaga 4440  
ttttgatttg attgacttgt acattgctaa gtatggatc aatattgaca acgttgaaaa 4500  
agttatgaat atggattcta ccaagattgc acggatgctt gttgatccta atgtttctcg 4560  
tgatgaaatt attgaaattt catcagcttt gactcctgct aaggctgaag agatcatcag 4620  
taagcttgat tttgggtgaaa tgattatggc tgtcaagaag atgcgcccac gtcgtaaagcc 4680  
tgacaaccag tgtcacgtta ccaatactgt tgataaccca gttcaaaattg ctgctgatgc 4740  
tgctgatgcc gctcttcgtg gatttccaga acaagaaacc acgacagctg tggcacgtta 4800  
tgccaccatc aatgctattt caattttat tggtgaccaa acaggctgcc ctgggtgtatt 4860  
gacacaatgt tctgttgaag aagctactga attgcaatggatgatgatggcgtt gtttaccgc 4920  
atatgctgaa accatttcag tttacggta tggatgtgttacccatg gtcgtatgatc 4980

tcatgggtct aaaggcttct tggcatcttgc ttatgcata cgtggtttga agatgcgatt 5040  
tacttcaggt gccggttcag aagtttgat gggttatcca gaaggtaagt caatgcttta 5100  
cccttgaagcg cgttgtatTT tacttactaa ggcttcaggt gttcaaggac ttcaaaatgg 5160  
tgccgtaagt tgtattgaaa ttccctggc ttttcctaat ggtattcgtg aagttctcgg 5220  
tgaaaacttg ttatgtatga tgtgtgacat cgaatgtgct tctgggttg accaagcata 5280  
ctcacactcc gatatgcggc ggactgaacg gtttattggc caatttattg ccggtaactga 5340  
ttatattaac tctggttact catcaactcc taactacgat aataccttcg ctggttcaaa 5400  
cactgatgct atggactacg atgatatgta ttttatggaa cgtgacttgg gtcaatatta 5460  
tggatttcac cctgttaagg aagaaaccat tattaaggca cgtataagg ccgctaaagc 5520  
ccctcaagca gtatTTgaag atcttggatt accaaagatt actgatgaag aggtcgaagc 5580  
agcaacgtat gctaaccaccc atgatgacat gccaaggcgg gatatggttg cagatatgaa 5640  
ggctgctcaa gatatgatgg atcgtggaat tactgctatt gatattatca aggattgt 5700  
caaccacgga tttaaagatg tcgctgaagc aatTTgaac cttcaaaaac aaaaagttgt 5760  
tggtgattac cttcaaacat cttctatTT tgataaagat tggAACgtca cttctgctgt 5820  
taacgacgga aatgatttac aaggaccagg tactggatac cgtctatatg aagacaagga 5880  
agaatgggat cggattaaag acttaccatt cgcccttgcat ccagaacatt tggactgt 5940  
gagaggaggt aatctgttat ggctgatatt gatgaaaact tattacgtaa aatcgtaaaa 6000  
gaagttttaa gcgaaaactaa tcaaatcgat actaagattg actttgataa aagtaatgt 6060  
agtactgcaa cagcaactca agaggtgcaa caaccaata gtaaagctgt tccagaaaag 6120  
aaacttgact ggttccaacc agttggagaa gcaaaacctg gatattctaa ggatgaagtt 6180  
gtatTTgcag tcggtcctgc attcgcaact gttcttgata agacagaac tggatttcct 6240  
cataaagaag tgcttcgtca agttattgct ggtattgaag aagaaggct taaggcgcgg 6300  
gtatTTaaag tttaccggag ttcagatgta gcattctgtg ctgttccaagg tgatcacctt 6360  
tctggttcag gaatttgcata tggtatccaa tcaaaaaggaa cgacagttat tcaccaaaag 6420  
gatcaagacc ctcttggtaa ccttgagttt ttcccacaag cgccagtaact tactcccgaa 6480

acttatacgta caattggtaa gaatgccgct atgtatgcta agggtgaatc tccagaacca 6540  
gttccagcta aaaacgatca acttgctcgt attcaactatc aagctatttc agcaattatg 6600  
catattcgta aaactcacca agttgttgtt ggtaagcctg aagaagaat taaggttacg 6660  
tttatttaag gaggcagaat gatgagtgaa gttgatgatt tagtagcaaa gatcatggct 6720  
cagatggaa acagttcatc tgctaatacg tctacaggta cttcaactgc aagtactagt 6780  
aaggaaatga cagcagatga ttaccactt tatcaaaagc accgtgattt agtaaaaaca 6840  
ccaaaaggac acaatcttga tgacatcaat ttacaaaaag tagtaaataa tcaagttgat 6900  
ccctaaggaat tacggattac accagaagca ttgaaacttc aaggtgaat tgcagcta 6960  
gctggccgtc cagctattca aaagaatctt caacgagctg cagaatttaac acgagttac 7020  
gacgaacggg ttcttgaat gtatgatgca ttgcgtcctt tccgttcaac taagcaagaa 7080  
ttattgaaca ttgcaaagga attacggac aagttatgacg ctaatgtttg cgcagcatgg 7140  
tttgaagaag ctgctgatta ttatgaaagt cgttagaagc taaagggcga taactaagct 7200  
tttttagtcag agtagggagt tttatgtatg gcaactgaaa aagtaattgg tgttgatatt 7260  
ggaattctt ccactgaagt tgcattggca gatgttaagcg atagtgccca agttcacttt 7320  
attnaactctg gtattgctcc tactactggg attaaaggta ctaaggcagaa tctagttgga 7380  
attaggatt caattactca agttctgaat aaatctaatac tgacaatcga tgatattgat 7440  
ttaattcgaa tcaatgaagc cacggcagta attgggtatg ttgcaatgga aactattaca 7500  
gaaacagttg taacagaatc aacaatgatt gggcataatc ctaatacacc aggtggata 7560  
ggaacagggg ctggataac agttcgtttgc ttgatctct taaagaaaac tgataaaagc 7620  
aaaaattata ttgtttagt tcctaaggat attgattttg aagacgttgc taaacttatac 7680  
aatgcttatac ttgcctctgg ttataaaata acagcagcaa ttctaaagaaa cgatgatgg 7740  
gttttagttt gataatcggtt aaatcataaa attccgatttgc tgcgtatgatgatt 7800  
gacaaagttc cgtaaatat gctggcagct gtagaagttg ctggccctgg acaagtaatt 7860  
tcacaacttt caaaccgtt tggtatcgct accttatttg gactaactcc agaagagact 7920  
aagaatatttgc ttccagtttgc tcgagcgtt attggaaatc gttcggtgt tgttatata 7980

actccagctg gggatgttaa agcgcgagta attccagcag gtaaaatcat aattaatgg 8040  
gatactggaa aagaagaagt tggagttct gaagggtgctg acgccattat gaaaaagg 8100  
tctagttcc gccatattaa caatataact ggtgagtcg gaaccaatgt tggaggaatg 8160  
ttggaaaatg ttcgtaaac aatggcagat cttacaggaa agaaaaatga tgaatttgct 8220  
attcaagatt tacttgctgt tgataactcaa gtaccagttg aagttcgagg cggtctagct 8280  
ggtgaattct caaatgaatc agcagttggg atcgcagcaa tggttaagtc agatcatctt 8340  
caaatggaag ttattgctaa acttattgaa aaagaattta atacaaagg 8400  
tgaatttggt ggtgctgaag ttgaatctgc aattcgtgga gcattaacaa ctccaggaac agataagcca 8460  
atcgcaatcc ttgattttagg tgctggctca acagatgctt caatcattaa taaagaaaat 8520  
aatacagttg caattcactt agctggtgct ggtgatatgg taacgatgat tattaattct 8580  
gaattaggat tgaatgatat tcatcttgca gaagacatca aacgctaccc attagcaaag 8640  
gtagaaaacc ttttcaaatt tcgacatgag gatggttcg 8700  
ttcaattctt taaagatccg  
cttccatcat cactgtttgc caaagttgt aatttgcattt 8760  
gttcaattctt taaagatccg  
actggaaatc caagcattga aaaaattaaa tttagtgcgtc aagtgcaaa gaaacgagta 8820  
tttggtaga acgctttacg ggcacttaag tatgttagtc caactggaaa tattcgtgat 8880  
attccgtttg ttgtattgt cggtggttca gccttagact ttgaaattcc acaacttgc 8940  
acagatgaat tagcacactt taatttagtt gctggtcgag gaaatgttcg tggagttgaa 9000  
ggaccacgaa atgccgttgc aactggattt attttaaggt atggcgaaga aagaaggaag 9060  
cgttatgaac aacgatgatt cacaacgtcc ctgcatttgc gtccggactag aaaaatggaaat 9120  
aacgattcca gatagtgta agccactttt ttatggattt gaagaagaac agatcccagt 9180  
ctcagtttgt aaaaatcaata taaatgatac tggatggaa 9240  
gcataaccaat cagctcttgc  
atcaaggcta tctgttagaa ttgcgtttga aggagatcat ttatgttc actataagaa 9300  
cttaaaaagaa aatcagccctt tatttgcattt gacaatcaat gataaaaagc aattacgaat 9360  
tttaggagca aatgcagcga gatttagtaaa aggaatccct tttaggaaa tggcaaacag 9420  
gtgatattat tatgaagtct ttgggtatg tagaatgtaa tggattatct ggccgttattg 9480

tggctgctga caggatgcta aaaactgcag atgttgaact tagtagtatt caaaatacga 9540  
aaggtaatgg atgggtcacc ttacaagttt ctggtaact atcagctata actgttgcgg 9600  
ttcaagctgt aaaagactat ttacctgatg tataatgtAAC gtcagcgata atagggcgTC 9660  
cagcaatagg gttgaactcc ttgggcaaaa cagatttatt gcaaccaaAT ccagaaaAGC 9720  
agcaaaatAT tgctgaaaAG gaaaaggTTG ctgaaccATC ttcaattAAA gaagagatAG 9780  
tacagaatAG tgaaaATTCT gctgaaccta gtgttcaaAC tgagcgatCA tttagaggcA 9840  
aagatgaaAT cgaagcttCG gattcgTcta atgataaACA agataccAAAC tctaattgATA 9900  
atgaagtcAC atgcaatATG tgtggagatC caaaatgtCC acggaaatTA ggagaaccGC 9960  
ataagaagtG tatccattAC aatgaattAA agaaaaAGTA ggaggAAATA actatgAA 10020  
acgctttagg aatgattgAA acacgcggAT tagttgcATC tattgaagCT gctgatcAAA 10080  
tggtaaaggc tgctaattgTA acattaACTg gccaaGAAAA gattggtagT ggattggtaA 10140  
ctgttatgat tcgtggtgat gttggtgctg taaaggctgc cgttgatgCT ggtgtacaAG 10200  
ctgctgaagg tgtcggcgAA gttgtatcgt cttacgtaat tcctcgTCca catgaagaAG 10260  
ttgaaaagat tttaccaggt ggatcagatt cagacgctgA atagaaaATT ttaataaaaa 10320  
ggaagattAC gtatggatgA agaacattTA agaacactTA tccggacgat tgtagagAA 10380  
acacttaatC ctaacctAGT tccaaATTGt gtttcaaATC accatgtACA tttgacggAA 10440  
gaagactttC aaaagctatt ccctggtcaa aagattgAAA tgctaaAGAA acttcgtCAA 10500  
catgcggact ttgctgCAA gcaaactgTT gatctgatcG ggcccaAGG caccattgAA 10560  
catgttgcTC taatggggCC ataccgttCA cactcacagg tagaaattgc ccgttcagAA 10620  
aacatttacAC taggaattgA tgctccaATT agaatgtCTG gtgatcttGA tggcacCCt 10680  
tcaatttaagg ttgggtcacc atatgcggAA attgaaaATTc aaggtgtAAT tggcacaAG 10740  
cgacacatCC acatgagttt agaagatgCC aagcgctttG gcgtaaAGCT cggtgattCA 10800  
atgcaggttG aagtagatgg cgatggtgGA cgtaaaACCA tttttgatgA cgtagttgCT 10860  
cgccctcgTG aagactttgt ccttgaaaATG catattgata ctgatgaaAGC caatgcAGCT 10920  
aatgtcggAC taggtataAA ttctttcgGA aaagtttATA tcaagaAGAA aaactaactT 10980

tttggaaaac taataagggg gtgaatagat ggataaccta gtacaacagg ttatgcaacg 11040  
attagaagaa cgaaggcata cgagcggtga agttactttt aatcatcaag ttgcggcgcc 11100  
tagtgaacag attttttga gaaacggaaa agttattcta aaagatattt cgattgagtt 11160  
aataacggac ttatattcaa tggaaaagac taacgcttgg gttaaatggg tgtagaagg 11220  
aatttagctat gatgttaat tttactttt aatataatgaa cagatggta attttattcc 11280  
acggatgatg attttggact ggccgatctt gtttgttgta aataacgaat cgccagtaat 11340  
tgccagttat aatcgattt ttaccagaga agagatagct gctaaaccag ataaatcgat 11400  
tcttggtaga tatcaaaaagc aacatattac agatgaagca ctgtatct gtaactataa 11460  
aaaaattaaa ataaagatta ggactgaaga aaattgtata tggcgagagt agtaggttagt 11520  
gttggtagaa cccaaaagga tccatcctta gttggaaaga aactaatgat agttcaacag 11580  
attaattccg accaacaacc agttcgattt gaacaagttt ccgctgatac agtaaatgct 11640  
gggattggtg ataatgtatt aatagttcgt ggtgctggtg caagacgtgc tgataaagag 11700  
cgtagatgagg atcaagtaag ggacgttaat gactgtacga tagttggat aattgaccgt 11760  
tttgataagt agtgcattt ggaggcatca aaatggctat ttacacaaaa ggtggtgaca 11820  
agggagaaac aagtttattt gatggaaacga gggtacctaa ggattcatta cgagttgaaa 11880  
cttatggaaac tttttagttaa tttaacgcta atattatgtt ggcagataaa ttctgtgaaa 11940  
gttaacgtaa taagaagctt ttacaagaga tcgaatataa aatgttttc ctcaaggtg 12000  
agatagcgac agaaaaacgg cagtttttca ctgataaaag taagattatt actgatgaag 12060  
atactcgaaa acttgaaaag gttattgtatg aatatacatac aaaactgcca cctgttcata 12120  
gttttatctt acctgggtcg agtactgcgg gtgcacaact tcataattgt cgaacaatct 12180  
gtcgtagtgc agagcgacta tttgtgcggc tatcaaaagaa tgtaaaattt cgtccagagc 12240  
tagaaagata tattatcgat ttgtcggtt ttttatataat tgtagcgcgt gatgaagact 12300  
atgaagattt attaaatagt gtaactgtatg acgtgttaaa aatttacaaa cgttatcaag 12360  
aagaaaagga tgtgcgttaa gaatggaaacga ggaacaaatt agtaagatg ttgaaaacgt 12420  
aatcaagaat aatgcttcta aaaatctatt tgatcggtcac aaaatggaaa aagtaatcg 12480

tgccggctgtat gctcgctgtat atgaatttggg tttggatgtt acaattgtat ttatgaaagc 12540  
tgatcaagta ttgcggatgtat gctaccatat gccaaatgtt aatttatgtt gttgtacttt 12600  
agctcctaaa aaggcatggt cagcatttagt aatggaaatcc cttaccaagg atattatgtt 12660  
ggatatccaa ccagggtggcg gattatatca aatggaaaca atgcttgcgtt gtaagtttagc 12720  
atcttttgcg ggtgggtattt cattgtatgtt taacgtatgtt attattggatgtt cgattgggtgt 12780  
tagtgggtggat ttgggttgcgtt aagatcaatc aatttgttgcgtt gctgctgttgcgtt cagaatttttt 12840  
gaaggagagt aagtagatgtt gcagatgttgcgtt gatattgttgcgtt gtgtgttgcgtt caaaattttttt 12900  
gccgaagaac tagataatgc cagctttca agtgcaaaacgtt ttcgcgttgcgtt tactgtatgtt 12960  
ggtcatcgcg gaattttcac taatgtcaat gatgcaatttgcgtt cttgcgttgcgtt agctgttgcgtt 13020  
gaaatataatc gggataagcc aattgtgtttt cggccaaacaag tgattgtatgtt cattaaaggaa 13080  
ggattccggcc catatattgtt aaaaatggctt aaagatgtatgtt aagaagaaac aggaatgggaa 13140  
acagtagagg cccaaatttgcgtt taagttaaac aatgccttgcgtt acaacactcc tggtcccgag 13200  
attcttgcgtt cagttgtatgtt aacgggtgtt ggtggatgtt ttatgtatgtt acggtttacca 13260  
tatggtggttta ttgggtgcgtt tggcccaagt acaaaccctt cagaaactgtt aattgtatgtt 13320  
gcgatcatgtt tgcttgcgtt tggtaatact ctgttactttgcgtt gtcgttgcgtt cttgcgttgcgtt 13380  
aatgttactc gctggacaat tgaaaagatgtt aacgatgttgcgtt ttgcgttgcgtt aacaggccgtt 13440  
cataatttatgtt tggtatgtt tgaaacacca acaattgtatgtt cagttcaaca aatgtatgtt 13500  
caccggacaat ttgcgttgcgtt agcagtaact ggtggcccgatgtt ctgttgcgtt ccaagcaatgtt 13560  
accagtggttgcgtt agaaagcggtt tggtgttgcgtt cctggtaatc ctgttgcgtt ggttgcgtt 13620  
actgctgtatgtt ttgtatgttgcgtt tgctcataat atcattacat ctgttgcgtt tgataatgtt 13680  
attttatgtt ctgttgcgtt aacggccacc cagttgcgtt aatgtatgtt aatgtatgtt 13740  
cgtaagatgtt aagatgtatgtt tgcgttgcgtt gtttacccgtt aacaaggccgtt taaattgtatgtt 13800  
gatatgtgtatgtt tccaaagaaaa tgggtgttgcgtt gatgtatgtt ttgttgcgtt aatgtatgtt 13860  
tatatcttagt accaagctaa tattccttac acaggccacc cagttgcgtt aatgtatgtt 13920  
cttccttgcgtt aacatccatt agtaatgtatgtt gaaatgtatgtt tgccaaatgtt accagttgtt 13980

tcttgccaa catttgatga tgtttgaag actgctgtt aagttaaaa aggttaaccat 14040  
cacacagcta ctattcatc caataacctt aagcatatta ataatgctgc tcaccggatg 14100  
caatgttcaa tctttgttgt taatggccca tcctatgtt gtagcagggt tgcagataat 14160  
ggagctcact caggtgcttc agcattaaca attgctacgc caactgggtga aggaacatgt 14220  
actgcacgaa catttactcg tcgggttcgt ttgaactcac cacaaggatt ctcagtagt 14280  
aactggtatt aatgggaggc ataattccaa tggaaaaata tagtatgcca acccggattt 14340  
attcgggaac agatagttt aaaaaactag agacacttaa taatgaacgt attttattag 14400  
tctgtgattc tttcttgccct ggttagtgata ccttaaaaga aattgagagt cacattaagg 14460  
ataataataa gtgtgaaatt ttctctgatg ttgtccccga tcctccacta gataagat 14520  
tggaaagggt tcaacaattc cttaaactta aaccaacaat tgtgattggt atcggtggcg 14580  
gatcagctt ggatactggt aaggaaattc gttttttgg tgaaaaagttt ggcaagtgca 14640  
agatcaatga atatattgct attccaacaa cgagtggtac tggttcagaa gttacgaata 14700  
ctgcggttat ttctgatacg aaaaaacatc gtaaaaattcc tattttggaa gattatttga 14760  
cacctgattt tgctttacta gatecctaaac tagttatgac tgctccctaa agtgttaactg 14820  
catattcagg aatggatgtt ttaacacatg cacttgaatc tttggttgct aaggatgca 14880  
atttattcac agttgcatta tcagaagaag caattgatgc cgttattaaa catttatgtt 14940  
agtgttatcg tcacggcgat aatgtggatg ctcgtaagat tggttcatgaa gcatcaaata 15000  
ttgccggaac tgcatttaat attgctggat tagggatttt ccactcaatt ggcgcataat 15060  
tgggagctaa ttccacgtt ccccatggtt tagcaaatac aatgctcttgc ccatatgtta 15120  
tcgcataataa tgctgaacat agtgaagagg cattgcataa gtttgcattt gctgctaaga 15180  
aagctggaat tgctgctcct ggagtaggct atcgctttgc agtaaagcga ctaattgcta 15240  
aaatttaggga aatggcacga caaatgaatt gtccaatgac tcttcaagca ttcgggtttt 15300  
atcctgctaa agctgaagaa ttagctgata ctgttggatc aatgctggaa aagatgca 15360  
cattccctgg caatccagtt gttcccttcag ataatgatct gaagatggtt tacgaagca 15420  
taattcgta atttagttt tttggagtgat tttgatgtca aaaaaatac ttgcattaa 15480

ttctggtagt tcatcaatta agttcaaact ttactttagt ccagaggaga aactattaat 15540  
tagtggttct gctgaaaatc ttgggttcttc gacaagtcag ctttcatata aactgataa 15600  
aactaacgag acaagacaaa tccctttaaa aaaccactca gaggcaattt accatattat 15660  
tgcgttttta atgtcttagtg gggttgttaa ggataagtca gaaattttatg gtgttggtca 15720  
ccggatttct catggcgaa gttactatac tcatgcagtg gcagtcactc cagaagttga 15780  
aaaacggatt gatgaatttg aggtgttatac acctctgcat aatccaaatg gactagcagg 15840  
gataaaagcc tttgaaaagt ttcttcaga tgccaggaa gtagttactt tcgataattc 15900  
atttcatcat acaatcccta agaaagctta tatgtatgct ttgccatatg agttttatga 15960  
aaagtatcaa attaggcgct acgggttcca tgcccttca catcagttatg tgtcagaaaa 16020  
agcgcgtgaa ctttttggta aagaaaagac tcgtcgatg atcacgtgtc atttgggaaa 16080  
tggatcaagc gtttcggcga tcttagatgg aaagtcggtt aactcttcaa tgggttttac 16140  
tccgttagca ggtgttagtga tggaaacgcg atgtggagat attgatccag aaattattcc 16200  
ttttcttgaa gaagaactca atattgattc acatgaaatg cgtcgaataa tgaatgaaga 16260  
ctcagggttt aaaggcttat ctgggatttc taatgatgaa cgtgagattg aaagtgcggc 16320  
taaaaaacggt aacgaacggg cacaattagc ttttagatgta tttgtacatt caattcaaca 16380  
atataatttggaa gcatatacaa cggatcttga tggattggat acatttagtat ttacagccgg 16440  
aattggtgaa catgctgctt atattagaag tcagatctgt aagaattttag actatcttgg 16500  
agtcaaaattt gacgaagaga aaaataaaaaa taatgagcta agcattgaag cacctgatag 16560  
taaggttaaa atagctgtta ttccaactaa cgaagaaaata attattggcc gtgatgtaat 16620  
gaatgttaact cagcaataaa atggggatga tactatggct aggcaggata tcaaacggac 16680  
aattcaagaa tatgttccgg gtaaacaggt aacattagca catatcggtt ctaaccctac 16740  
gccagacatt tatgagaaat tagggataca aactcctaaa aatgcgttgc gtatgttgc 16800  
aataacgcca agtgaagcct caattatcgcc tggggatatt gctacaaaatg cgagtaatgt 16860  
tactcttaggg ttcattgtatc gattttagtg ctcgggttgc attgtgggag aagtttctg 16920  
aattgaatca gctttgcgtc atgtgggttgc taagctacaa acgttactgg ggtttgatgt 16980

tcctgaaatt acacgaacat aacattagaa gtgtattcat ttacgctaac gtgttaga 17040  
tgaatacact ttttagaaag gagggagatg caatatggcg aatcatcagc gaattctagc 17100  
gttgaaaat ggattnatt ttcgagatct tggtggttat agaactattg atggcggaaag 17160  
tctgaaatgg aataatcttg ttcgttctgc gcattctcc tattttacac ataatgagca 17220  
aagaaaactt tatggatatg gtattaggac aattattgac tttcggttcaa cttccgaagt 17280  
agcttttat cccgaccaat taacatcatt gatgaattat attcggatac cggtctttga 17340  
gaatgacctt actgaaagta atattagtat tgctgaagca cgaaaaagtt tttcaaagga 17400  
tccacaagcg ggtttaatc gcatgatgga agtatattgt caatttgc ctgatgagaa 17460  
agcacaagaa gcatttcaca cctttattaa aaaattatgc ctacattcag cgcagggtgg 17520  
tgtttattt cattgctctg cggggaaaga ccgtactggt ttaggagcaa tttatTTact 17580  
aagtcttcta caagttccag tagatataat ttatcaagat tatattttaa ctaataaagc 17640  
atcaacaaaa aggataaaag aacgattacg ttatgctata aaaaataacc taggtataa 17700  
ttatcttac tcaatttacg atctttcaac agcaaatagg tggtaattatg atcaagcaat 17760  
ctctcttatt aataataaat atgggtggaat gacctttaac ttaaaagatg tggtaaaaaat 17820  
cagtgattca atgggtgaac aactaagata cttatatctg acgggtgaa tttaggctta 17880  
gtaaaaatTA aaagccattg atataataat ggctaaaaaa gagggctagaa ttgaatagcc 17940  
tcttaacat acataattct tataggtgga tggtaataat gacaactttt ttttaattcg 18000  
tcacggggaa acctatgcta atcgattaaa ttatatccaa ggtacattaa atgatagatt 18060  
aacaagtctg accaaacagg gaatgctgga agcagcgaat tatcaaaaat tgggtgataa 18120  
taatcaaatt gattatgtct atacaagtcc gtttaaggcga gcagtaaaaa cggggcaaat 18180  
aatttgtgct acgactaata ttaagttgca ggtttagtggaa cgtctagcag aaatatctta 18240  
cggttaaatgg aatggggcag atattagtaa attaaagcaa cagtattcga tgtatTTGA 18300  
tggtaaaacg aatgacgtgc gaccacattc aattttgata aatcaaggcg aaaaactttga 18360  
acatgctcgt gcacgaatat ggtcatTTT attggatact tcttataagt atccacaaca 18420  
aaatatttta ataattacac atggctggat aataaaaaat atcattcgt tgtgtcttga 18480

gaatattgat gggacttcat taaaaatcc caataatcta agtatttagta agatccaatt 18540  
gaatccggca ttaaagcagc aacgaatatg ttattataat cgaccgttca tagggacgat 18600  
gatattatga gtcttattac aattctttg atatttgg gacttaatat tgatacgtt 18660  
attgcactat tatttctttt acgaaactat aattaccggt taccgattat tggctttgga 18720  
gtagcaacgc ttatttatg gatctttggg gtaattttag gaaaaggcgt agcatttcta 18780  
tttccagatt ggattacagg atttatggc attatttaa tctttatagc gcttttgaa 18840  
caggatgacg aaaaaaagac aactaataca agttttctct cattacttct gtttggtaa 18900  
agccttggtg gagataatct tgctgttat attccattgg tggttaacct tagttggagt 18960  
cagattatat acgttaggaat aattttgaa atttgttcag tcctattat tctattagga 19020  
aaacaatttg ttttaataaa acctgtggca tatttggg 19080  
agcaaaattg tttatgtttt agcgggttta tatattatgg gaaatagtca tttatattat 19140  
cacttatata gaattttaa ttaagttcag caactaattt atcgatattt atatttcaa 19200  
ctgccgaaac aggaattacc ttctttaccc cagcgcttaa cagaagatcc ttggaaatatt 19260  
caatgtcgac agggtctttt acaagatcaa tctttgtAAC tacacctaaa gtaggtttcg 19320  
aaaacattga acagaagcca gcccggaaaaa caagtcgtt gtcaaccgca ctttggtaata 19380  
aaacaactat atcagcatec atcgaggttac cacgttaacgt gctcatcata ttatgtatgct 19440  
ccatataatc tcctgggttg tcaataatat ttgatgaaaa ttcaattgtt tgtgtttat 19500  
tatatttaat ttgttgattt tctaattcggtt gagtaagggt tttttacca catgttattg 19560  
ctccgataaa catagttcgt ttcataatattt aatacctcca ccaattctac aaaaatatac 19620  
tatttatctg tattataata aaagcggttac cacatagcca tagataaaaaa aagatttagtg 19680  
aggaattata gatgctaaca gcacatgttag tttatgccac gatgactggtaataatgagg 19740  
aagtagcaaa cattgtatgt gatagtttga ctaatttaaa tggtaaagtg acagagtcgt 19800  
agatatcaca aactgatgttgcagattttt tgaaggctga catttttagtt gtttggctt 19860

<210> 54

<211> 708

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 54

atgcatggat ttattggcga atttttggc accatggttt taatcctatt aggagcagga 60  
tggtgtgctg gtaatagttt gaataaaaaca tatggaaac aaagtggctg gtggtttatac 120  
tgtatttcat ggggcttagc agttacaatg ggagtttatg ttgcaggatt tctgggttca 180  
tttagggcact taaatcccgc tgtaacaatt ccttttgc ta ttttggctt attcccatgg 240  
agtaacgtta taccttactt acttggtcaa tttcttggtg cgtttggtt tgca gtttattta 300  
gtaatttattc aattctatcc acaatttaaa gcaacccaa atgaagaaga aggaataat 360  
gttggtatTT ttgctactcg tccagcgata aatagtccaa ttttaactt tttctcagaa 420  
gtgattgcga cctttgcatt tattttcatc ttattaaatc ttggcaactt tacacaggga 480  
ttgaagccat ttatcgtagg aatggttatt gcagttggtg gtacatgtct cgggacaact 540  
actggctttg cattaaaccc agctcggtat tggtcaccac gtttagcata tactatTT 600  
ccaattccta ataagggtgt ttcaagaatgg tggtagtgc ggttccaaat gtgtggccca 660  
attgttgggg gccttcttgc ttgtgtttt caaacggcac tagtttag 708

<210> 55

<211> 834

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 55

ataaaaaaag aatttttaaa aagtagtaat gaacaattaa aaaaattttc cgagattgtt 60  
aatggggata agcctttacg taaagttacg gctgatgaaa agctaaaggc cggtgttagat 120  
ttaggaacctt ctcaattgt tttaacagtg ctggattcca aagataagat tgtatacgg 180  
gcgtatgaat atgaccatgc agttcaagat ggtattgtat ttaatttcat ggaatcgtt 240  
aatatTTaa gacgcttaaa agaaaaagct gagaaaggat taggacgtga acttaaaacg 300  
gcgtgtggtg ctattccacc gaagacagga gagaagagtg ccaaagtgg tgctaattgtt 360  
atcgaagaga caggcttgct ttgtacaggt gttgaagatg aaccgacagc agctgcgaag 420  
ttcttaagat tgtcaaattgg tacagttgtat gatattggag gaggaacaac tggatttagt 480

atttttaaag ataacaagct catccatgtt attgatgaag caacaggcgg atttcataatg 540  
acgcttgttc ttggaggaag atataaaata aaaaatgatg aagcagaaaa attaaagcgt 600  
aacaagaata aagaatctga agtataatgct gttattaaac ctgttagttga gaaaatggca 660  
gcaatttgttc aaaatatggg agtagaaatt attgatccag taatagtggt gggaggtgca 720  
actaacttta ctgaatttac aacaaccttt agtaaagatt taaagcgtaa agtttataaa 780  
ccgctttatc ctcaatttgtt tagccacta gggattgcaa tgttttagatgatgatg 834

<210> 56  
<211> 1080  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus reuteri*

agtaataaag cagggtgggt ctatacagta gattgttctc aacctattat tccagctagt 1020

gagattaatg tatttgcgtt ttcagtaatt caatggattt atactgaaaa aattatcaa 1080

<210> 57

<211> 282

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 57

atgggacaag aagcacttgg tttattgaa accgaaggac ttgttagcttc aattgaagct 60

gctgatgcaa tggtaaaagc tgctaattttt aaatttattt gtcagaaaaa gattggtcat 120

ggatttagtca cagtaatggc tcgtgggtat gttggagctg ttaaggcttc agttgatgcc 180

ggagtacaag ctggcgaaaa tattggagaa gttgtttcga gttacgtaat tcctcgccct 240

caatctgaag ttgataagct cttaccgcat catggagaat aa 282

<210> 58

<211> 717

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 58

atgaatgatt ttctgaattt tactagtaact gttccagaat ttgttggtgc tagcgaaatt 60

ggagatacca ttggaatggt aattccgaga gttgatcaac aactattttaga taaattacac 120

gttacaaaac aatacaagac ttttaggtatt ttgagtgatc gtactggtgc tggtccacaa 180

attatggcaa tggatgaagg aatTAAGGCT actaacatgg aatgtatttga ttttgaatgg 240

ccacgtgata ctaaagggtgg aggaggccat ggatgtttaa ttatcatgg tggtgatgat 300

cctgcagatg cacgccaagc tattcggtt gcacttgata atcttcatcg tacatgg 360

gacgtttata acgccaaagc gggcacctt gaattacaat ttacagctcg tgctgcagg 420

gctgcacatc ttggattagg tgcagttgaa gggaaagcat ttgggttcat ttgtgggtgt 480

ccctccggga ttgggtgtgt gatgggagat aaggctttaa agactgctgg ttttgaaccg 540

cttaacttta cttcaccaag tcatggtaca agtttctcta acgaagggttg cctaactatt 600

accggtgact caggagctgt tcgtcaagct gttatggctg gacgtgaagt aggattaaag 660

ttattgtcac agtttgtga agaaccagtt aatgatttcc catcatacat taagtag 717

<210> 59

<211> 570

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 59

atgaagtc ttggctatgt agaatgtaat ggattatctg gcgcattgtt ggctgctgac 60

aggatgctaa aaactgcaga tggtaactt agtagtattc aaaatacgaa aggtatgga 120

tgggtcacct tacaagttt c tggtaacta tcagctataa ctgttgcgg tcaagctgta 180

aaagactatt tacctgatgt atatgtaacg tcagcgataa tagggcgtcc agcaataggg 240

ttgaactcct tggcaaaaac agatttattt g caaccaaattc cagaaaagca gcaaaatattt 300

gctgaaaagg aaaaggttgc tgaaccatct tcaattaaag aagagatagt acagaatagt 360

gaaaattctg ctgaacctag tggtaactt gatcgatcat tagagggcaa agatgaaatc 420

gaaagcttcgg attcgtctaa tgataaaca gataccact ctaatgataa tgaagtcaca 480

tgcataatgt gtggagatcc aaaatgtcca cggaaattag gagaaccgca taagaagtgt 540

atccattaca atgaattaaa gaaaaagtag 570

<210> 60

<211> 291

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 60

atgaataacg cttaggaat gattgaaaca cgcggattag ttgcattat tgaagctgct 60

gatcaaatgg taaaggctgc taatgtaaca ttactggcc aagaaaagat tggtagtgg 120

ttggtaactg ttatgattcg tggtgatgtt ggtgctgtt aggctgccc t gatgctgg 180

gtacaagctg ctgaagggtgt cggcgaagtt gtatgtctt acgttaattcc tcgtccacat 240

gaagaagttg aaaagatttt accaggtgga tcagattcag acgctgaata g 291

<210> 61

<211> 645

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 61

atggatgaag aacat ttaag aac ac ttatc cgg ac gat tg tt aga gaa ac act ttaat cct 60  
aac ct tag ttc caat tgg t gt tt caa atc ac cat gt ac tatt tg ac gga a g a gac ttt caa 120  
a ag ct tatt cc ct ggt caaaa gatt gaa atg c taa agaa ac tt cgt caa c a tg cgg ac ttt 180  
g ct gca a a g c aa a c t gtt ga t ct gt ac ggg ccc a aagg ca cc att gaa c a t gtt cgt ct a 240  
at ggg gccat acc gtt caca ctc ac a ggt a gaa att gccc gtt caga aaaa ct tt a cact a 300  
g gaa tt gat g ct cc aatt ag aat g tct ggt gat ct t gat g gc acc cct tc aat t aagg tt 360  
cg gt caccat at g cgg a aat t gaa att c a a ggt gta att g tt gca a a g c g ac a cat cc ac 420  
at g a gtt tag a a gat gcc a a g c gct t t ggc g taa a gct cg g t gatt caat g c a ggt t gaa 480  
g t a gat ggc g at ggt g gac g taaa accatt ttt gat gac g tag tt gct cg cc ct cgt gaa 540  
gact tt gtcc tt gaa at gca tatt gata ct gat gaa gcca at g c a gct a a t g t cgg a c t a 600  
g gta aata aatt ct t cgg a a a gtt tatt atc a a g a a g a a a a a c t a a 645

<210> 62

<211> 504

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 62

atggataacc tagtacaaca ggttatgcaa cgattagaag aac gaa agca tac g a g c gtt 60  
g a a gtt a ctt ttaatcatca agtt gccccg cct agt gaa c agat tttttt g a g a a a c g g a 120  
aa agttat tc taaa agat at ttc gatt gag ttaata a cgg act ttaat tc aat ggaaa a a g 180  
act a a c g ctt g g gtt a a a t g g g ttttagaa g g a a t t a g c t a t g a t g t t a a a t t t a cttt 240  
ttaat t a a t g a a c a g a t g g t t a a t t t t a t t c c a c g g a t g a t g t t g g a c t g g c c g a t c 300  
t t g t t t g t g t g t a a a t a a a c g a a t c g c c a g t a a t t g c a g t t a a t t a c c a g a 360  
g a a g a g a t a g c t g c t a a a c c a g a t a a a t c g a t t c t t g t t a g a t a t c a a a a g c a a c a t a t t 420  
a c a g a t g a a g c a c t t g a t a t c t g t a a c t a t a a a a a t t a a a g a t t a g g a c t g a a 480  
g a a a a t t g t a t a t g g c g a g a g t a g 504

<210> 63  
<211> 273  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 63  
atggcgagag tagtaggtag ttttggca accccaaaagg atccatcctt agttggaaag 60  
aaactaatga tagttcaaca gattaattcc gaccaacaac cagttcgatt tgaacaagtt 120  
gcccgtgata cagtaaatgc tgggattgggt gataatgtat taatagttcg tggtgctgg 180  
gcaagacgtg ctgataaaga gcgtgatgag gatcaagtaa gggacgttaa tgactgtacg 240  
atagttggaa taattgaccg ttttgcataag tag 273

<210> 64  
<211> 609  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 64  
gtgtgcattg gaggcatcaa aatggctatt tacacaaaag gtggtgacaa gggagaaaaca  
agtttattcg atggaacgag ggtacctaag gattcattac gagttgaaac ttatggaact  
tttgcataat taaacgctaa tattagtttgc cagataaaat tctgtgaaag taaacgtaat  
aagaagcttt tacaagagat cgaatataaa atgttttcc ttcaaggtga gatagcgaca  
gaaaaacggc agtattttac tgataaaagt aagattatta ctgatgaaga tactcgaaaa  
cttgcggagg ttattgatga atatacatca aaactgccac ctgttcatag ttttatctta  
cctgggttcga gtactgcggg tgcacaactt catatttgcgaaatctg tcgtcggtca  
gagcgactat ttgtgcggct atcaaagaat gtaaaaatttc gtccagagct agaaagatat  
atataatcgtt tgcggattt tttatataatt gtgcgcgtg atgaagacta tgaagattta  
ttaaaatagtg taactgatga cgtgttaaaa atttacaaac gttatcaaga agaaaaggat  
gtgcgttaa 609

$\langle 210 \rangle$  65  
 $\langle 211 \rangle$  474

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 65

atgaacgagg aacaaattag taagattttt gaaaacgtaa tcaagaataa tgcttctaaa 60  
aatctatttg atcggcaca aatggaaaaa gtaatcgatg cggctgttagc tcgtgcta 120  
gaattgggtg ttggagtaac aattgctatt atgaaagctg atcaagtatt gcaa atgagc 180  
taccatatgc caaatgctaa tttagtaagt tgtactttttag ctccctaaaaa ggcatggtca 240  
gcatttagcaa tgaaggaacc taccaaggat attagtaagg atatccaaacc aggtgcgg 300  
ttatatacaaa tggaaacaat gcttgatggt aagtttagcat cttttgcagg tggtattcca 360  
ttgaagat ta acgatgaaat tattggagcg attgggtgtt a gtgggtggatt ggttgaagaa 420  
gatcaatcaa tttgtgaagc tgctgttgca gaatttttga aggagagtaa gtag 474

<210> 66

<211> 348

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 66

atggcttaggc aggatatacaa acggacaattt caagaatatg ttccgggtaa acaggtaaca 60  
tttagcacata tcgttgctaa ccctacgcca gacatttatg agaaattttagg gatacaaact 120  
ccctaaaaatg cgcttggatat ttgacaata acgccaatgt aagcctcaat tatcgctggg 180  
gatattgcta caaagtccag taatgttact ctagggttca ttgatcgatt tagtggctcg 240  
gttgtatattg tgggagaagt ttctgaaattt gaaatcagctt tgcgtcatgt gtttgataag 300  
ctacaaaacgt tactggggtt tgatgttccct gaaattacac gaacataa 348

<210> 67

<211> 795

<212> DNA

<213> Lactobacillus reuteri

<400> 67

atggcgaatc atcagcgaat tctagcgttt gaaaatggat ttaattttcg agatcttgg 60  
ggttatagaa ctattgtatgg cgaaagtctg aatggataa atcttgcatttgc ttctgcgc 120

ctctcctatt ttacacataa tgagcaaaga aaactttatg gatatggtat taggacaatt 180  
attgactttc gttcaacttc cgaagtagct ttttatcccg accaattaac atcattgatg 240  
aattatattc ggataccggt ctttgagaat gaccttactg aaagtaatat tagtattgct 300  
gaagcacgaa aaagttttc aaaggatcca caagcgggtt ttaatcgcat gatggaagta 360  
tattgtcaat ttgtcaactga tgagaaagca caagaaggcat ttcacacctt tattaaaaaa 420  
ttatgcctac attcagcgca gggtggtgtt ttatttcatt gctctgcggg gaaagaccgt 480  
actggtttag gagcaattt a ttactaagt cttctacaag ttccagtaga tataatttt 540  
caagattata tttaactaa taaagcatca aaaaaagga taaaagaacg attacgttat 600  
gctataaaaa ataacctagg tgataattat cttcaactcaa ttacgatct ttcaacagca 660  
aataggtgtt attatgatca agcaatctct cttattaata ataaatatgg tggaatgacc 720  
tcttacttaa aagatgtgtt acaaatcagt gattcaatgg ttgaacaact aagatactta 780  
tatctgacaa agtga 795

<210> 68  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 68  
atgtattttg atgttcaaac gaatgacgtg cgaccacatt caatttgat aaatcaaggc 60  
gaaaactttg aacatgctcg tgcacgaata tggtcatttt tattggatac ttcttataag 120  
tatccacaac aaaatatttt aataattaca catggctgga taataaaaaa tatcatttcg 180  
ttgtgtcttg agaatattga tgggacttca ttcaaaaatc ccaataatct aagtatttagt 240  
aagatccaat tgaatccggc attaaggcag caacgaatat gttattataa tcgaccgttc 300  
ataggacga tcatattatg a 321

<210> 69  
<211> 558  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 69

at gagtctta ttacaattct tttgatattt gtgggactta atattgatac gtttattgca 60  
ctattatttc tttacgaaa ctataattac cggttaccga ttattggctt tggagtagca 120  
acgcttattt tatggatctt tgggtaatt ttagaaaaag ggctagcatt tctattcca 180  
gattggatTA caggattat gggcattatt ttaatcttta tagcgcttt tgaacaggat 240  
gacaaaaaaa agacaactaa tacaagttt ctctcattac ttctgtttt ttaagcctt 300  
ggtggagata atcttgctgt ttatattcca ttggtggtt accttagttg gagtcagatt 360  
atatacgtag gaataatttt tgaatttgt tcagtcctat taattctatt aggaaaacaa 420  
tttgtttaa taaaacctgt ggcataattt tggaaaaat atggtaattt tggaaagcaa 480  
atgtttatg ttttagcggg tttatataattt atttggata gtcatttaat taatcacctt 540  
attagaattt ttaattaa 558

<210> 70  
<211> 429  
<212> DNA  
<213> *Lactobacillus reuteri*

<400> 70  
at gaaaacgaa ctatgtttat cggagcaata gcatgtggta aacaaaccct tactcaacga 60  
ttagaaaaatc aacaaattaa atataataaa acacaagcaa ttgaattttc atcaaattatt 120  
attgacacac caggagaata tatggagcat cataatatga tgagcacgtt acgtgttaacc 180  
tcgatggatg ctgatatagt tgtttattt caaagtgcgg ttgacaaacg acttgtttt 240  
ccggctggct tctgttcaat gtttcgaaa cctactttag gtgttagttac aaagattgat 300  
cttgtaaaag accctgcccga cattgaatat tccaagaatc ttctgttaag cgctgggta 360  
aagaaggtaa ttccctgtttc ggcagttgaa aatattaata tcgataaatt agttgctgaa 420  
cttaattaa 429

<210> 71  
<211> 65  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 71

atggaccgca ttattcaatc accgggtaaa tacatccagg gcgcgtatgt gattaatcg 60  
taacc 65

<210> 72

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 72

ctgggcgaat acctgaagcc gctggcagaa cgctggtag tggtgggtga caaatttg 58

<210> 73

<211> 1257

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 73

atggaccgca ttattcaatc accgggtaaa tacatccagg gcgcgtatgt gattaatcg 60  
taaccatgtt caaaacgacg ctctgcgcct tattaattac cgccctttgc tccacatttg 120

ctgccccctca acaaataaac gatattgtgc atcgacaaat taccggcgtt atagagcaac 180

aaaagatccc gggatggcg gtggcggtaa tttatcaggg taaaccttat tactttacct 240

ggggctatgc ggacatcgcc aaaaagcagc ccgtcacaca gcaaacgttg tttgagttag 300

gttcggtcag caaaacattt actggcggtgc ttgggtggcga cgctattgtc cgaggggaaa 360

tcaagttaag cgatcccaca acaaaaatact ggcctgaact taccgctaaa cagtggaatg 420

ggatcacact attacatctc gcaacctaca ctgctggcgg cctgccatcg caggtgccgg 480

atgagggtgaa atcctcaagc gacttgctgc gcttctatca aaactggcag cctgcattgg 540

ctccaggaac acaacgtctg tatgccaact ccagtatcg tttgttcggc gcactggctg 600

tgaagccgtc tggttttagt tttgagcagg cgatgcaaac tcgtgtctc cagccactca 660

aactcaacca tacgtggatt aatgtaccgc ccgcagaaga aaagaattac gcctgggat 720  
atcgcgagg taaggcagtgcatgttcgc ctggggcggt agatgctgaa gcttatggtg 780  
tgaagtcgac cattgaagat atggcccgct gggtgcaaaag caatttaaaa ccccttgata 840  
tcaatgagaa aacgcttcaa caaggataac aactggcaca atctcgctac tggcaaacg 900  
gcgatatgta tcagggcctg ggctggaaa tgctggactg gccggtaaat cctgacagca 960  
tcattaaacgg cagtgacaat aaaattgcac tggcagcagc ccccgtaaaa gcgattacgc 1020  
cccccaactcc tgcagtagcgc gcatcatggg tacataaaac agggggcgacc ggccggatgg 1080  
gtagctatgt cgcgtttatt ccagaaaaag agctgggtat cgtgatgctg gcaaacaaaa 1140  
actatcccaa tccagcgaga gtcgacgccc cctggcagat tcttaacgct ctacagtaac 1200  
tggcgaata cctgaagccg ctggcagaac gctggtagt ggtgggtgac aaatttg 1257

<210> 74  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> synthetic DNA

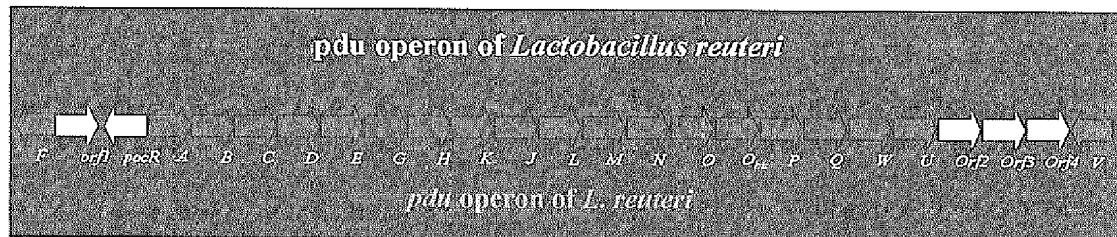
<400> 74  
ggaattttagg ttttcgcaa accagctatt tttgcaaagt gtttgcgg 50

<210> 75  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Artificial

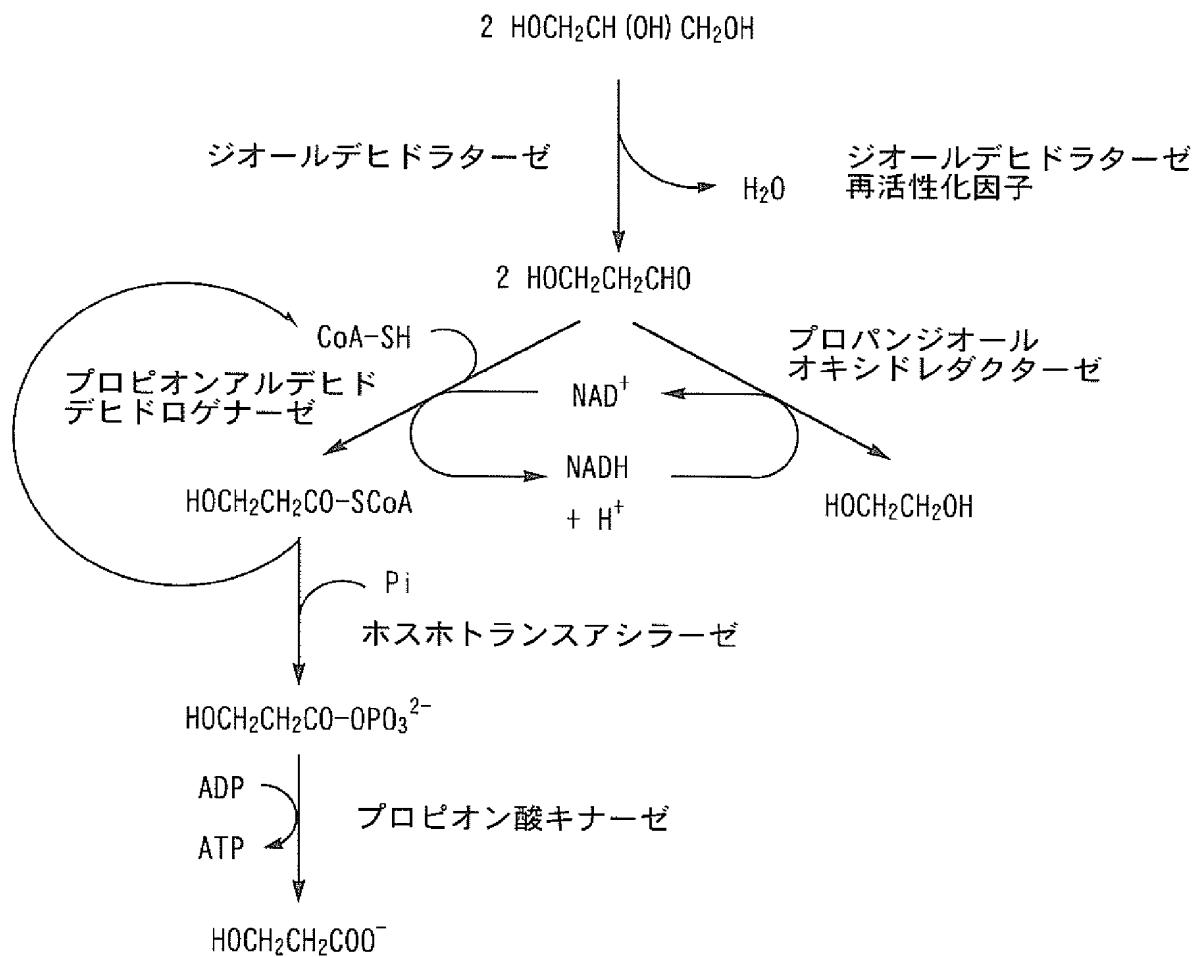
<220>  
<223> synthetic DNA

<400> 75  
atcgataccc ccggggataa tctggaaaac cgctgcgtgt acagtgca 50

【書類名】 図面  
【図 1】



## 【図2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 本発明は、グリセロールから1，3-プロパンジオールを製造する際の効率性を改善し、工業上有用なプロセスを提供することを目的とする。

【解決手段】 *Lactobacillus*属細菌、*Salmonella*属細菌、*Klebsiella*属細菌、*Listeria*属細菌、*Clostridium*属細菌、*Escherichia*属細菌、*Enterobacter*属細菌、*Caloramator*属細菌、*Acetobacterium*属細菌、*Brucella*属細菌、*Flavobacterium*属細菌、*Fusobacterium*属細菌、*Citrobacter*属細菌及び*Propionibacterium*属細菌から選択される細菌において、グリセロールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子がノックアウトされたノックアウト細菌。

【選択図】 なし

出願人履歴

0 0 0 0 0 4 6 2 8

20001206

住所変更

5 9 3 1 4 6 9 6 9

大阪府大阪市中央区高麗橋 4 丁目 1 番 1 号

株式会社日本触媒